



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Área de investigación Microbiología  
Cátedra de Microbiología  
Lab. Resistencia Bacteriana

## **Genes de Resistencia a Quinolonas De Localización Plasmídica en *Enterobacteriaceae***

### **Tesis**

para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Giovanna Rincón C  
Bacterióloga, U Andes, Msc U. Nacional.  
Colombia

Director  
Gabriel Gutkind  
Cátedra de Microbiología  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
UBA

Director adjunto  
Jose Di Conza  
Laboratorio de Resistencia Bacteriana  
Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.  
Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL.

Aprobación de Ingreso Exp 732.252/10  
Aprobación Plan de Tesis Exp 2732252/13

Febrero  
2015

---

---

*A Mi familia  
por su apoyo incondicional  
y a las chicas del fondo (2011- 2015),  
Por que sin ellas, jamas habria sido lo  
mismo.*



---

## **Agradecimientos**

De las partes de esta tesis, esta sección es la más difícil de escribir para mí, tal vez porque no existen las palabras para expresar todo lo agradecida que estoy con toda la gente que me rodea y todo lo que han hecho para que yo culmine a tiempo y con éxito este proceso.

Quiero agradecer a mis directores Gabriel y José, por todas sus enseñanzas, por permitirme tener una de las más bonitas experiencias y por su apoyo académico, especialmente por todo el apoyo y trabajo intensivo de las últimas semanas, que permitieron que cumpla con todos los objetivos propuestos.

A Gabriel por permitirme ingresar al laboratorio sin conocerme ni tener referencias sobre mí y aún así aceptarme como su tesista. A José por toda su confianza y acompañamiento.

A Marcela Radice porque fue una directora más para mí en este trabajo, ya que siempre conte con su apoyo y por las mejores reuniones de trabajo de cada verano.

A Marta y Laura para quienes a pesar de no ser “gram positiva” siempre sentí su apoyo incondicional y por supuesto a Pablo y Magui.

A Mary y Flor por sacarme de más de un lío y permitirme probar los ricos sabores de la comida hecha en casa y con cariño.

Y por supuesto a ustedes “las chicas del fondo”, gracias por permitirme ser una más de ustedes, porque además de mis compañeras se convirtieron en mis amigas, en parte de mi familia, y me permitieron vivir cosas maravillosas tanto dentro del laboratorio como fuera de él: Marian, Meli, Lu Pino, Sabri, Barby, Silvi, Dani, Vero, Sol, Lu Barby A, Alan, Litterio (que también hace parte de una de nosotros), a Joha INTA. A algunos que ya no están: Andrea, Esteban, Aleja, Mariela, Lili Fernández, Aye y por supuesto a los que van ingresando y a los que pasaron y dejaron huella como Fanny y Mile.

A pesar de que tengo que partir siento que en mi corazón siempre seré una de las “chicas del fondo”. Gracias por el mate y por hacerme sentir como en casa.

A Sammy por todo el trabajo que iniciaste, así como a la gente de Perú por los aislamientos y a la profe Marta Jacome, Marta L Hincapie, Marbelis Montes, Clara Sanchez y la gente del HUS que aportaron la parte de la población bacteriana estudiada.

---

A las personas que confiaron en mí y pusieron más que su nombre para que yo pudiera comenzar esta aventura: Germán, Cami, Arturo y Alba Lucia.

A mis compañeros de Trabajo de la Escuela, a mis amigos de la Universidad que siempre estuvieron pendientes del proceso.

A Oscar por todos los artículos y su apoyo incondicional aún a la distancia.

A mi familia, mi mamá, mi hermano, mis tías, tios, mi novio, mis primos especialmente Alex que me aguantaste durante estos cuatro años y a Mabel que sólo te di trabajo y problemas y por supuesto a los que ya no están, pero me acompañan desde donde esten.

Y a la pregunta: ¿Que si me arrepiento?.....si tuviera que decidirlo otra vez no escogeria otro lugar en el mundo para realizar este proceso. Parte de mi se queda acá y espero que este no sea un adiós si no un hasta pronto!!.

Los quiero montones y les agradezco enormemente el hacerme sentir como en casa.

---

## Publicaciones Obtenidas de esta Tesis Doctoral

### Publicaciones en Artículos.

✚ Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* in Argentina.

Rincón G, Radice M, Sennati S, Pallecchi L, Rossolini GM, Gutkind G, Di Conza JA. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Issue: 108(7) November 2013. Pag 924-927. DOI: 10.1590/0074-0276130084

✚ First report of plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump QepA in *Escherichia coli* clinical isolate ST68, in South America. Rincón G, Radice M, Giovanakis M, Di Conza J, Gutkind G. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014 May; 79(1:70-2. doi:10.1016/j.diagmicrobio. 2014.01.007.

### Presentaciones en Congresos.

#### Orales

VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica SADEBAC 2012.

✚ Detección de *qepA*, *qnrB10* y *aac(6')-Ib-cr* en un aislamiento de *Escherichia coli* resistente a quinolonas.

Rincón G, Radice M, Giovanakis M, Di Conza J, Gutkind G.

Sociedad Argentina de Infectología (SADI) 2014

✚ Presencia de genes de resistencia a quinolonas codificadas en plásmidos, en aislamientos clínicos de *E. coli* de Perú y Argentina.

Rincón G, Radice M, Gutkind G, Di Conza J.

✚ Caracterización del gen QepA en dos cepas clínicas de *E. coli*, análisis comparativo.

Rincón G, Radice M, Giovanakis M, Sevilla C, Puray M, Gutkind G, Di Conza J.

#### Poster

VII Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica SADEBAC 2012.

✚ Resistencia a quinolonas mediadas por plásmidos en *Enterobacteriaceae*.

Rincón G, Di Conza J, Radice M, Gutkind G.

Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2012, San Francisco)

✚ Prevalence of plasmid mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin resistant *Enterobacteriaceae*.

---

Rincón G, Radice M, Sennati S, Pallecchi L, Rossolini GM, Di Conza J, Gutkind G.

XIII Congreso Argentino de Microbiología 2013 y II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental 2013.

✚ Secuenciotipos prevalentes en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* multiresistentes.

Rincón G, Radice M, Sennati S, Pallecchi L, Rossolini GM, Gutkind G, Di Conza J.

✚ Detección de la bomba de multidroga OqxAB en *Escherichia coli* aislados en Lima, Perú.

Rincon G, Radice M, Sevilla Andrade C, Puray Chavez M, Di Conza J, Gutkind G.

Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2013, Denver, Colorado)

✚ Prevalence of Plasmid Mediated Quinolone Resistance Determinants among ESBL producing *Enterobacteriaceae* in Lima, Perú.

Rincon G, Radice M, Sevilla Andrade C, Puray Chavez M, Gutkind. G, Di Conza J.

Sociedad Argentina de Infectología (SADI) 2014

✚ Detección de genes de resistencia a quinolonas codificadas en plásmidos en aislamientos clínicos de un hospital de tercer nivel colombiano.

Elena AX, Rincón G, Radice M, Rios M, Di conza J, Gutkind G.

Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2014, Washington D.C.)

✚ Characterization of Three Clinical isolates of *Escherichia coli* Carrying *oqxAB* Genes.

Rincón G, Radice M, Sevilla Andrade C, Puray Chavez M, Di Conza J, Gutkind G.

---

## Indice

Lista de Figuras	10
Lista de Tablas	12
Lista de símbolos y Abreviaturas	13
RESUMEN	15
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>17</b>
<b>1.0 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA</b>	<b>21</b>
1.1 Enterobacterias	21
1.2 Resistencia Bacteriana en <i>Enterobacteriaceae</i>	21
1.2.1 Mecanismos de Resistencia a $\beta$ - lactámicos y Quinolonas.	25
1.2.1.1 $\beta$ -Lactamasas.	25
1.2.1.2 Quinolonas y Fluoquinolonas	27
1.2.1.3 Mecanismos de acción de las quinolonas	28
1.2.1.4 Mecanismo de resistencia a quinolonas	28
1.2.1.4.1 Resistencia Cromosómica	28
1.2.1.4.1.1 Alteración del sitio de unión:	28
1.2.1.4.1.2 Disminución de la concentración del antibacteriano:	29
1.2.1.4.2 Mecanismos de resistencia a quinolonas codificadas en plásmidos	30
1.2.1.4.2.1 <i>qnrA</i>	31
1.2.1.4.2.2 <i>qnrS</i>	31
1.2.1.4.2.3 <i>qnrB</i>	31
1.2.1.4.2.4 <i>qnrC</i>	32
1.2.1.4.2.5 <i>qnrD</i>	32
1.2.1.4.2.6 <i>qnrVC</i>	32
1.2.1.4.2.7 <i>qepA</i>	32
1.2.1.4.2.8 <i>OqxAB</i>	33
1.2.1.4.2.9 <i>aac (6')-Ib-cr</i> .	33
1.3 Elementos de transferencia de genes PMQR.	33
<b>2.0 OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
2.1 Objetivo general	41
2.2 Objetivos específicos	41
<b>3.0 MATERIALES Y METODOS</b>	<b>45</b>
3.1 Aislamientos Bacterianos:	45
3.1.1 Aislamientos de Argentina	45
3.1.2 Aislamientos de Perú	45
3.1.3 Aislamientos de Colombia	46
3.1.4 Aislamientos de laboratorio	46
3.2 Identificación Bacteriana	46
3.3 Conservación de los microorganismos	46
3.4 Determinación de sensibilidad y detección de mecanismos de resistencia	47



---

3.4.1 Ensayos de difusión en medio sólido con discos	47
3.4.2 Concentración inhibitoria mínima	47
3.5 Caracterización genotípica de resistencia a quinolonas.	48
3.5.1 Extracción de ADN Total.	48
3.5.2 Extracción de ADN plasmídico.	48
3.5.3 Determinación de genes por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	48
3.5.3.1. Identificación de mutaciones <i>QRDR</i> .	48
3.5.3.1.1 Análisis de las mutaciones <i>QRDR</i> .	49
3.5.3.2 Detección de genes PMQR	49
3.5.3.2.1 <i>qnrA</i> y <i>qnrS</i>	49
3.5.3.2.2 <i>qnrB</i>	49
3.5.3.2.3 <i>qnrC</i> y <i>qnrD</i>	50
3.5.3.2.4 <i>qnrVC</i>	50
3.5.3.2.5 <i>aac(6')-Ib-cr</i>	51
3.5.3.2.6 <i>oqxAB</i>	52
3.5.3.2.7 <i>qepA</i>	53
3.5.3.3 Geles de Agarosa	53
3.5.3.4 Purificación de amplicones	54
3.5.3.5 Secuenciación	54
3.5.3.6 Análisis de secuencias	54
3.5.3.7 Clonado de productos de PCR.	54
3.5.3.7.1 Digestión enzimática para detección de <i>qnrB19</i>	55
3.6 Determinación de otros genes.	55
3.7 Transferencia de genes	55
3.7.1 Conjugación	55
3.7.2 Electroporación	56
3.8 Análisis de plásmidos	57
3.8.1 Determinación del número y tamaño de plásmidos por electroforesis de campo pulsado con S1-nucleasa.	57
3.8.1.1 Preparación de los <i>plugs</i> de agarosa.	57
3.8.1.2 Digestión con S1 nucleasa	59
3.8.2 Clasificación de plásmidos de acuerdo a la tipificación de replicones ( <i>PBRT</i> )	59
3.8.3 Southern Blot	61
3.8.3.1 Transferencia de geles	61
3.8.3.2 Hibridación	62
3.9 Análisis de los aislamientos clínicos.	63
3.9.1 Grupos filogenéticos	63
3.9.2 Clonalidad	65
3.9.2.1 ERIC y REP PCR.	66
3.9.2.2 Digestión con <i>XbaI</i> .	66
3.9.2.3 <i>Multilocus sequence Typing</i> (MLST)	67
3.9.2.3.1 MLST <i>E. coli</i>	67
3.9.2.3.2 MLST de <i>K. pneumoniae</i> .	67
3.9.3 Detección de genes de virulencia <i>magA</i> y <i>rpmA</i> en <i>K. pneumoniae</i> .	68
3.9.4 Entornos genéticos de <i>QepA</i> y <i>OqxAB</i>	68
3.9.4.1 Diseño de <i>primers</i> de <i>qepA</i>	68
3.9.4.2 Diseño de <i>primers</i> de <i>oqxAB</i>	69
3.9.4.3 Manejo de amplicones	70

---

**4.0 RESULTADOS** **75**

<b>4.1 Argentina</b>	<b>75</b>
4.1.1 Sensibilidad antibiótica	75
4.1.1.1 Antibiograma por difusión.	75
4.1.1.2 Concentración inhibitoria minima (CIM).	76
4.1.2 Tipificación de la población	76
4.1.3 Detección de genes PMQR	77
4.1.3.1 Qnr	78
4.1.3.1.1 <i>qnrB</i>	78
4.1.3.2 <i>aac(6')-Ib-cr</i>	79
4.1.3.3 Bombas de eflujo QepA y OqxAB	81
4.1.3.3.1 QepA	81
4.1.3.3.2 OqxAB	81
4.1.3.4 PMQR y BLEE	81
<b>4.2. Perú</b>	<b>87</b>
4.2.1 Sensibilidad antibiótica	87
4.2.1.1 Antibiograma por difusión	87
4.2.1.2 Concentracion inhibitoria minima	87
4.2.2 Tipificación de la Población	88
4.2.3 Mutaciones Cromosomales en <i>QRDR</i>	89
4.2.4 Detección de genes PMQR	89
4.2.5 PMQR y BLEE	90
<b>4.3. Colombia</b>	<b>95</b>
4.3.1 Sensibilidad antibiótica	96
4.3.1.1 Antibiograma por difusion	96
4.3.2 Tipificación de la población	97
4.3.3 Detección de genes PMQR.	97
4.3.4 PMQR y BLEE/ AmpC	98
4.3.5 Comparación de las poblaciones con PMQR.	100
4.4 Comportamiento fenotípico de <i>aac(6')-Ib-cr</i> en las poblaciones de estudio	101
4.4.1 Aminoglicósidos	101
4.4.2 Quinolonas y Fluoroquinolonas	104
4.5 Caracterización de los aislamientos positivos para <i>qepA</i> y <i>oqxAB</i>	106
4.5.1 El gen <i>QepA</i>	106
4.5.1.1 Características de los aislamientos	106
4.5.1.2 Tipificación y caracterización de la resistencia acompañante.	108
4.5.1.4 Caracterización plasmidica	109
4.5.2 <i>OqxAB</i>	112
4.5.2.1 Características de los aislamientos.	112
4.5.2.2 Tipificación de los aislamientos.	112
4.5.2.3 Caracterización de los plásmidos	113

---

**5.0 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.** **119**

5.1 Sensibilidad antibiótica	119
5.2 Características de la Población de Estudio	121
5.3 Mutaciones QRDR en los aislamientos de Perú.	123

---

5.4 Determinantes PMQR.	124
5.4.1 Qnr	125
5.4.2 Enzima modificadora de aminoglicósidos Aac(6')-Ib-cr.	127
5.5.1 QepA	129
5.5.2 OqxAB	133
<b>6.0 CONCLUSIONES</b>	<b>143</b>
<b>7.0 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>149</b>
<b>ANEXO I: PROTOCOLOS</b>	<b>165</b>
<b>ANEXO II: <i>BUFFERY</i> SOLUCIONES</b>	<b>171</b>
<b>ANEXO III: <i>PRIMERS</i></b>	<b>177</b>
<b>ANEXO IV: RESULTADOS COMPLEMENTARIOS</b>	<b>181</b>
<b>ANEXO V: ARTICULOS</b>	<b>189</b>

---

## Lista de Figuras

Figura 1: Porcentaje de resistencia a fluoroquinolonas en aislamientos de <i>E. coli</i> invasivas, reportadas por EARSS para el 2013 .....	22
Figura 2: Porcentaje de resistencia a CTG reportados en aislamientos de <i>E. coli</i> invasivas por la EARSS 2013.....	23
Figura 3: Porcentaje de resistencia a fluoroquinolonas en aislamientos invasivos de <i>K. pneumoniae</i> reportados por EARSS 2013 .....	23
Figura 4: Porcentaje de resistencia en aislamientos invasivos de <i>K. pneumoniae</i> a CTG, reportados por EARSS 2013 .....	24
Figura 5: Dendrograma de la familia de las BLEE tipo CTX-M .....	26
Figura 6 : Estructura de la ADN girasa (A2B2).....	29
Figura 7: Representación esquemática de genes en casete con <i>qnrA</i> .....	35
Figura 8: Contexto genético de <i>qepA</i> .....	37
Figura 9: Estructura básica de un integrón.....	38
Figura 10: Disposición de discos sugeridos por SADEBAC-AAM.....	47
Figura 11: Sitio de corte y patrones de digestión de la enzima <i>BSEGI</i> .....	52
Figura 12 : Fragmentos amplificados con los <i>primers</i> utilizados en la detección de los genes de OqxAB.....	53
Figura 13: Sitio de corte y condiciones de digestión del <i>qnrB19</i> con la enzima de restricción <i>BseGI</i> .....	55
Figura 14 Esquema utilizado para la transferencia de geles.....	62
Figura 15: Árbol dicotómico para determinar el grupo filogenético en <i>E. coli</i> (Clermont <i>et al</i> ) .....	65
Figura 16: Patrones obtenidos en cada grupo filogenético por multiplex PCR.....	65
Figura 17: Porcentaje de sensibilidad antibiótica por antibiograma .....	75
Figura 18: Patrón fenotípico no usual encontrado en los aislamientos B5, CV1 y CM1 a los discos de GEN y AMK.....	76
Figura 19: Porcentaje de Sensibilidad por CIM .....	76
Figura 20: ERIC-PCR y distribución de grupos filogenéticos de <i>E. coli</i> de Argentina.....	77
Figura 21: PCR de <i>qnrA</i> , <i>qnrS</i> y <i>qnrB</i> en aislamientos de Argentina .....	78
Figura 22: Alelos de <i>qnrB</i> encontrados en los aislamientos de Argentina .....	79
Figura 23: Distribución de los genes <i>aac(6')-Ib</i> y su variante <i>aac(6')-Ib-cr</i> en Argentina.....	80
Figura 24: PCR y RFLP para la detección de <i>aac(6')-Ib-cr</i> .....	81
Figura 25: Relación entre <i>aac(6')-Ib</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> y $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. ....	82
Figura 26: Sensibilidad por antibiograma de los aislamientos de Perú.....	87
Figura 27: Sensibilidad por CIM de los aislamientos de Perú.....	87
Figura 28: Distribución de los grupos filogenéticos en <i>E. coli</i> Perú.....	88
Figura 29: ERIC de los aislamientos de <i>E. coli</i> de Perú.....	88
Figura 30: ERIC de los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> de Perú .....	89

---

Figura 31: Distribución de BLEE en los aislamientos de Perú .....	90
Figura 32: Relación BLEE y PMQR Perú .....	91
Figura 33: Antibiograma por difusión en medio sólido y pruebas confirmatorias, según SABEBAC-AAM .....	95
Figura 34: Sensibilidad en los aislamientos de Colombia .....	96
Figura 35: Perfil de sensibilidad a otros antibióticos de los aislamientos de Colombia .....	96
Figura 36: Grupos filogenéticos en aislamientos de <i>E. coli</i> .....	97
Figura 37: amplificación por PCR <i>qnrS</i> .....	98
Figura 38: Fenotipos de los aislamientos Argentinos ante AMK, GEN y TOB .....	101
Figura 39: Fenotipo de los aislamientos de Perú a AMK, GEN, KAN y TOB .....	102
Figura 40: Fenotipo de los aislamientos de Colombia a GEN y KAN .....	103
Figura 41: Diferencia entre LVX-CIP en <i>E. coli</i> .....	105
Figura 42: Diferencia LVX- CIP en <i>K. pneumoniae</i> .....	105
Figura 43: Antibiograma Inicial y confirmatorio del aislamiento C27 .....	107
Figura 44: PFGE de aislamientos con <i>qepA</i> .....	108
Figura 45: Contexto genético de los aislamientos B2 y UR1 .....	111
Figura 46: Patrones obtenidos en el PFGE con <i>XbaI</i> de los aislamientos con <i>oqxAB</i> positivos. ....	112
Figura 47: S1 Nucleasa -PFGE .....	114
Figura 48: Mapeo genético del aislamiento DAC3 las electroporantes <i>oqxAB</i> de ER2 y ER3 .....	116
Figura 49: Contexto genético de los aislamientos B2 y UR1 .....	133
Figura 50: Entorno genético de <i>oqxA</i> y <i>oqxB</i> .....	137
Figura 51: Mapa del vector de clonación pJET 1.2 y <i>primers</i> utilizados para la secuenciación.....	169

## Lista de Tablas

Tabla 1 Niveles de Sensibilidad a quinolonas .....	25
Tabla 2: <i>Primers</i> y condiciones de amplificación utilizados para la detección de <i>gyrA</i> y <i>parC</i> .....	48
Tabla 3: <i>Primers</i> y condiciones de amplificación utilizados para la detección de <i>qnrA</i> y <i>qnrS</i> .....	49
Tabla 4: <i>Primers</i> y condiciones de amplificación utilizados para la detección de <i>qnrB</i> .....	50
Tabla 5: <i>Primers</i> y condiciones de amplificación utilizados para la detección de <i>qnrC</i> y <i>qnrD</i> .....	50
Tabla 6: <i>Primers</i> y condiciones de amplificación utilizados para la detección de <i>qnrVC</i> .....	51
Tabla 7: <i>Primers</i> y condiciones de amplificación utilizados para la detección del gen <i>aac(6')-Ib</i> .....	51
Tabla 8: <i>Primers</i> y condiciones de amplificación utilizados para la detección de los genes <i>oqxA</i> y <i>oqxB</i> .....	52
Tabla 9: <i>Primers</i> y condiciones de amplificación utilizados para la detección del gen <i>qepA</i> .....	53
Tabla 10: Dilución con PIV según DO .....	58
Tabla 11: Multiplex para la tipificación por PCR basada en los grupos (inc/rep) para plásmidos de <i>Enterobacteriaceae</i> .....	60
Tabla 12: condiciones de amplificación utilizados para la para la tipificación por <i>PBRT</i> .....	61
Tabla 13: <i>Primers</i> y condiciones de amplificación utilizados para la detección de los genes para la determinación de grupos filogenéticos en <i>E. coli</i> .....	64
Tabla 14: <i>Primers</i> y condiciones de amplificación utilizados para ERIC y REP-PCR .....	66
Tabla 15: <i>Primers</i> y condiciones de amplificación utilizados para la detección de los genes <i>magA</i> y <i>rpmA</i> .....	68
Tabla 16: <i>Primers</i> utilizados en el entorno del gen <i>qepA</i> .....	68
Tabla 17: Condiciones de amplificación utilizadas para el mapeo del gen <i>qepA</i> .....	69
Tabla 18: <i>Primers</i> utilizados en el mapeo por PCR de los aislamientos positivos para <i>OqxAB</i> .....	70
Tabla 19: Condiciones generales de amplificación para el mapeo de los genes de <i>oqxA</i> y <i>oqxB</i> .....	70
Tabla 20: Relación BLEE y los alelos de <i>qnrB</i> .....	82
Tabla 21: CIM <sub>50</sub> y CIM <sub>90</sub> en <i>K. pneumoniae</i> .....	83
Tabla 22: Principales características de los aislamientos PMQR Argentina .....	85
Tabla 23: Características de los aislamientos de Perú .....	93
Tabla 24: Características de los aislamientos con PMQR de Colombia .....	99
Tabla 25: Resumen de los genes PMQR detectados en las poblaciones de estudio .....	100
Tabla 26: Grupos filogenéticos en <i>E. coli</i> con PMQR .....	101
Tabla 27: Relación CIP y LVX de los aislamientos de estudio .....	106
Tabla 28: Aislamientos con diferencia $\Delta$ LVX-CIP .....	106
Tabla 29: Sensibilidad antibiótica a quinolonas y aminoglicósidos .....	107
Tabla 30: Resultados de la prueba confirmatoria de BLEE .....	108

---

Tabla 31: Características de los aislamientos con <i>qepA</i> .....	109
Tabla 32: Características de Electroporantes y Conjugantes de los aislamientos B2 .....	110
Tabla 33: Características de las electroporantes de UR1 .....	110
Tabla 34: Sensibilidad antibiótica a quinolonas y aminoglicósidos .....	113
Tabla 35: Características de los aislamientos que presentaron <i>oqxAB</i> .....	113
Tabla 36: Caracterización de los plásmidos de los aislamientos y electroporantes de OqxAB .....	114

---

## Lista de símbolos y Abreviaturas

%: Porcentaje  
Δ: Diferencia  
β: Beta  
μl: microlitros  
3´CS: región conservada 3´  
5´CS: región conservada 5´  
A: Adenina  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
AMC: amoxicilina /ácido clavulánico  
AMK: amicacina  
APB: ácido fenil borónico  
Arg: arginina, también denominada R  
Asn: asparagina también puede denominarse N  
Asp: ácido aspártico, también puede denominarse D  
*BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*  
BLEE: β- lactamasa de espectro extendido  
CAZ: ceftazidima  
CIP: ciprofloxacina  
CL:cloranfenicol  
CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
CIM: concentración mínima inhibitoria  
CPM: concentración preventiva de mutantes  
CTG: Cefalosporina tercera generación  
CTX: cefotaxima  
DNTPs: 2´-deosinucleotidos 5´-trifosfato  
*EARSS: European Antimicrobial Resistance Surveillance System*  
EDTA: ácido etilendiamino tetracético  
ERIC-PCR: *Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based PCR.*  
EtBr: bromuro de etidio  
F: *forward*  
FQ: Fluoroquinolona  
G+C: porcentaje guanina, citosina  
GEN: gentamicina  
Glu: ácido glutámico, también puede denominarse E  
gr: gramos  
His: histidina, también puede denominarse H.  
HUS: Hospital Universitario de Santander  
I: Intermedio  
IMI: imipenem  
Inc: grupos de incompatibilidad  
IS: *Insertion sequences*  
KAN: kanamicina  
KCL: Cloruro de potasio  
Leu: leucina también puede denominarse L  
LVX: Levofloxacina  
Lys: lisina también puede denominarse K



---

MER: meropenem  
MFS: *major facilitator superfamily*  
mg: miligramos  
MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio  
mic: casete de inserción móvil  
ml: mililitros  
MLST: *Multilocus sequence Typing*  
NAL: ácido nalidixico  
ng: nanogramos  
NR: No reporta  
OMS: Organización mundial de la salud  
Pb: pares de bases  
PBRT: *PCR-based replicon typing*.  
PCR: *polymerase chain reaction*  
pMLST: *plasmid Multilocus Sequence Typing*  
PMQR: *Plasmid mediated quinolone resistance*  
qepA: *quinolone efflux pump*  
Qnr: *quinolone resistance*  
QRDR: quinolone resistance determinant  
R: resistente  
R: *revers*  
RCTG: Resistencia a cefalosporinas de tercera generación  
rep-PCR: *repetitive element palindromic PCR*.  
ROS: *Reactive Oxygen Species*  
rpm: revoluciones por minuto  
S: sensible  
SCTG: Sensible a cefalosporinas de tercera generación  
Ser: serina también puede ser denominada S  
Ta: Temperatura de anillaje  
TAZ: piperacilina/tazobactam  
TET: tetraciclina  
TMS: trimetoprima/sulfametaxol  
Tn: transposon  
TOB: tobramicina  
Trp: triptófano también puede ser denominada T  
Tyr: tirosina, también denominada Y  
U: Unidades

## Genes de Resistencia a Quinolonas De Localización Plasmídica en *Enterobacteriaceae*

### RESUMEN

A partir del 1998 se han reportado diferentes marcadores de resistencia a quinolonas de codificación plasmídica (PMQR) como las proteínas tipo Qnr, la variante de la enzima acetiltransferasa de aminoglicósidos (Aac(6')-Ib-cr) y las bombas de eflujo (QepA y OqxAB). A pesar de los elevados reportes de resistencia a quinolonas, son escasos los estudios acerca de los PMQR.

El objetivo de este estudio fue investigar la prevalencia de PMQR en cuatro grupos de *Enterobacteriaceae*, el primero de 57 aislamientos resistentes a cefalosporinas de tercera generación (RCTG) de Argentina, el segundo de 27 aislamientos RCTG de Lima, Perú y los últimos dos de origen Colombiano, (23 aislamientos RCTG y 32 aislamientos sensibles a cefalosporinas de tercera generación-SCTG); asimismo, se caracterizó un aislamiento Argentino de tipo SCTG, pero con altos niveles de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas.

Se determinó la sensibilidad de los aislamientos por CIM y antibiograma por difusión, siguiendo las recomendaciones del CLSI y AAM-SADEBAC. Los discos utilizados fueron: NAL, CIP, LVX, GEN, KAN, TET, AMK, AMC, CAZ, IMI, TAZ, MER, CTX y APB. Los genes PMQR fueron detectados por PCR y confirmados por secuenciación, se caracterizaron los aislamientos de *E. coli* y los plásmidos electroporados de QepA y OqxAB.

Como resultado se observó en Argentina, una sensibilidad a NAL de 7 %, CIP de 12 %, LVX 22,8 %, GAT 22,8 %, GEN de 40,4 %, AMK de 61,4 % y a TET de 40,4 %. En Perú este porcentaje fue a NAL de 3,7 %, CIP de 11,1 %, LVX del 22,2 %, a KAN 51,8 % y a TET de 18,5 %.

La población de Colombia en el grupo RCTG presentó una sensibilidad a NAL de 13 %, CIP 26 %, LVX 65,2 %, GEN 52,2 %, KAN 65,2 % y el grupo SCTG presentó sensibilidad a NAL de 46,1 %, a CIP y LVX de 68,8 %, GEN de 78,1 % y KAN de 96,8 %.

En Argentina, el 67,3 % de los aislamientos fue positivo para al menos un gen de PMQR, Los genes *aac(6)-Ib-cr* y *oqxAB* fueron detectados en un 38,6 % de los aislamientos. El marcador *qnrB* también fue encontrado en un 36,8 %. El alelo con mayor frecuencia fue *qnrB2* con 42,8 %, seguido de *qnrB19*, *qnrB10*, *qnrB6* y *qnrB1*. Se encontró una mayor asociación entre *aac(6)-Ib-cr* y CTX-M-15.

En el aislamiento de Argentina SCTG se detectó los genes *qnrB10*, *qepA1* y *aac(6)-Ib-cr*.

En Perú, el 85,2 % de los aislamientos (23/27) presentó al menos un gen de tipo PMQR. El gen *aac(6)-Ib-cr* se presentó en un 55,5 % (15/27), *qnrB* fue detectado en siete aislamientos (5 *qnrB19* y 2 *qnrB1*), *qnrS* se detectó en un aislamiento y cuatro *E. coli*, presentaron bombas de eflujo

(tres *OqxAB* y uno *QepA*). La variante *aac(6')-Ib-cr* se presentó en mayor proporción en aislamientos con CTX-M del grupo 1, mientras que *qepA* y *oqxAB*, se encontró en aislamientos con CTX-M del grupo 9.

En los aislamientos de Colombia RCTG, el 82,6 % de ellos presentaron al menos un gen de tipo PMQR, mientras que en los aislamientos SCTG este porcentaje fue de 28,1 %.

La frecuencia en que se presentó *qnrB* en el grupo RCTG fue de 47,8 % (8 *qnrB1* y 3 *qnrB19-like*), por otra parte en el grupo SCTG se encontró *qnrB1* en una frecuencia de 3,1 %. El gen *aac(6')-Ib-cr* fue detectado en un 65,2 % en el grupo de RCTG, mientras en el grupo de SCTG en un 18,7 %. Los genes *qnrS* y *qepA* se detectaron, cada uno en un aislamiento RCTG.

El resultado de la caracterización de *qepA1* de Argentina, mostró que el plásmido en que se encuentra codificado este gen, es de un tamaño cercano a 97Kb, *IncFIB*, *IncF* y el aislamiento con este mismo gen de Perú, presenta un tamaño de 90 Kb (*IncF*). Los dos plásmidos electroporados en *E. coli* DH5 $\alpha$ , presentaron un incremento de 4 a 7 veces el nivel de resistencia a CIP, en comparación a su receptora. El aislamiento de Colombia mostró una *qepA*, con 99 % de identidad con los dos alelos de *qepA* reportados.

El gen *oqxAB* de los aislamientos de *E. coli* se presentó en plásmidos de 100 Kb (*IncF*, *IncFIB*, *IncK*) y 90 Kb, mientras los plásmidos con *bla*<sub>CTX-M-65</sub> fueron *IncI1* con un tamaño cercano a 100 Kb.

Los genes *oqxAB*, y *qepA*, estuvieron asociados a secuencias de inserción de las familias IS6, como parte de su entorno.

En conclusión, se presenta una significativa resistencia a fluoroquinolonas en los aislamientos RCTG, además de una alta prevalencia de genes de tipo PMQR, siendo los genes de mayor frecuencia *aac(6')-Ib-cr* y *qnrB*. En los aislamientos de Colombia se observa diferencia en la frecuencia de PMQR entre los aislamientos RCTG comparado con los SCTG. Este trabajo es la primera descripción de la prevalencia de genes de tipo PMQR en aislamiento RCTG en poblaciones de Argentina, Perú y Colombia, así como la primera descripción y caracterización de *qepA* y *oqxAB* en aislamientos clínicos de sus países de origen.

**Palabras Claves:** *qnrB*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *oqxAB*, PMQR, Resistencia plasmídica a quinolonas,

## Genes de Resistencia a Quinolonas De Localización Plasmídica en *Enterobacteriaceae*

### INTRODUCCIÓN GENERAL

El Dr. Keiji Fokuda, en el último informe de la organización mundial de salud (OMS, 2014), alerta sobre la llegada de la era, donde infecciones comunes o lesiones menores pueden conllevar a la muerte como consecuencia de la alta resistencia bacteriana a muchos de los grupos de antibióticos (1) .

La resistencia bacteriana es un problema global, complejo, que incluye diferentes especies bacterianas, como puede ser observado en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, dos de las principales especies patógenas de la familia de las Enterobacterias, que vienen presentando un incremento en los niveles de resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, las fluoroquinolonas y carbapenemes, en particular para *K. pneumoniae* para este último grupo de antibióticos (1, 2)

La vigilancia de la resistencia antibiótica es un proceso crucial, que permite implementar estrategias para mantener la eficacia de los diferentes antibióticos, además genera herramientas que permiten al clínico instaurar terapias empíricas adecuadas, dependientes de los mecanismos de resistencia prevalentes en su región.

La resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas (FQ) ha sido ampliamente estudiada tanto en aislamientos clínicos humanos (3) y animales, microbiota comensal (6), aguas de desecho(4) y en alimentos de origen animal (5), observándose la tendencia al incremento en la resistencia en todas las áreas mencionadas.

Claro ejemplo de ello lo presentó el grupo de Bartoloni *et al* (6) quienes realizaron varios estudios de vigilancia de resistencia antibiótica en microbiota comensal en niños de poblaciones de America Latina a partir de 1990, y observaron un incremento en la resistencia a fluoroquinolonas a partir del 2000, que alcanzaron niveles en el 2011 de 76% para NAL y 44% para CIP, casi el doble de los encontrados en la misma población para el 2005, este incremento también fue observado para las cefalosporinas de espectro extendido.

Estos son datos preocupantes, primero por que las quinolonas no son comúnmente usados en población infantil y segundo por que la microbiota comensal puede servir de reserva de agentes causales en procesos infecciosos y de reservorio de genes de resistencia transmisibles entre diferentes especies (6).

Durante muchos años, se consideró que la resistencia a quinolonas y fluorquinolonas, solo podía ser obtenida por mecanismos codificados a nivel cromosomal como las mutaciones en regiones de las topoisomerasas, que involucraban el sitio de unión del antimicrobiano, y la activación de procesos de transporte donde se aumentaban la expulsión y/o disminuía el ingreso de sustancias nocivas (7). Estos mecanismos no explicaban completamente el fenómeno del incremento de la resistencia de manera no clonal y fue a partir de 1998, donde se encontró genes con capacidad de transmisión horizontal, codificados en plásmidos (PMQR), que permitían dar una mejor explicación al fenómeno de resistencia (7-9).

Los determinantes PMQR confieren bajo nivel de resistencia a quinolonas; puesto que estos facilitan las mutaciones cromosomales que elevan los valores de resistencia a las mismas (7). Aunque los determinantes PMQR y las mutaciones cromosomales se han estudiado desde su aparición, aun hacen falta un mayor número de estudios que den a conocer, la prevalencia de estos mecanismos de resistencia en países de América del Sur.

Es por ello que esta tesis se enfoca en determinar la prevalencia de PMQR en *Enterobacteriaceae* en cuatro grupos de aislamientos obtenidos de Argentina, Perú y Colombia.

Este documento se distribuye en seis capítulos: el primero donde se da la fundamentación teórica general, necesaria para el entendimiento del desarrollo del proyecto, el segundo plantea los objetivos generales y específicos propuestos, el tercero materiales y métodos, el cuarto resultados, el quinto discusión de resultados y por último las conclusiones.

# Fundamentación Teórica

---



## 1.0 Fundamentación Teórica

### 1.1 Enterobacterias

Las enterobacterias constituyen una gran familia de bacilos gram negativos con cerca de 25 géneros y 110 especies, quienes hacen parte natural de la microbiota gastrointestinal de humanos y animales (10).

La familia *Enterobacteriaceae* incluye bacilos gram negativos, que poseen un porcentaje de G+C en su ADN que varía entre el 39 al 59%, móviles con flagelo peritricos o no móviles, de fácil crecimiento, anaerobios facultativos, fermentan la glucosa y una amplia rango de carbohidratos, son oxidasa negativo y reducen los nitratos a nitritos (10).

Las bacterias entéricas generalmente no causan enfermedad, exceptuando los géneros de *Salmonella*, *Shigella* y algunos patovares de *E. coli*, que con considerados patógenos para el hombre; por el contrario las enterobacterias contribuyen con la adecuada función y los procesos de nutrición que se llevan a cabo en el tracto intestinal (10).

Estas bacterias son patogénicas, cuando adquieren factores de virulencia y/o cuando se encuentran fuera del tracto gastrointestinal, en sitios como el tracto urinario, el tracto biliar, la cavidad abdominal, pulmones, huesos, meninges, sangre, y pueden actuar como patógenos oportunistas cuando las defensas del hospedero son inadecuadas (10).

Dentro de las especies aisladas con mayor frecuencia en la clínica, se encuentra *E. coli*, pero pueden ser encontradas otras de las especies de enterobacterias tanto en infecciones adquiridas en la comunidad como en las adquiridas hospitalariamente y es conocida la emergencia de enterobacterias resistentes a una variedad de antimicrobianos de importancia clínica incluyendo el grupo de las quinolonas (10-12).

### 1.2 Resistencia Bacteriana en *Enterobacteriaceae*

El panorama en resistencia bacteriana ha cambiando durante los últimos años, Livermore reporta, que durante su trabajo en el Reino Unido (1997-2011) en el laboratorio de referencia y monitoreo de resistencia bacteriana, ha observado un incremento en la resistencia en bacterias gram negativas, debido a la propagación de enterobacterias resistentes a  $\beta$ -lactámicos y quinolonas (13).

La OMS en su informe del 2014 presenta para *E. coli* un nivel de resistencia a quinolonas similar al de las cefalosporinas de tercera generación (CTG) donde en cinco de las seis regiones de vigilancia<sup>1</sup> podría exceder el 50 %.

Los reportes de los sistemas de vigilancia como la EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*), muestran un incremento general en la aparición de aislados con resistencia combinada a CTG,

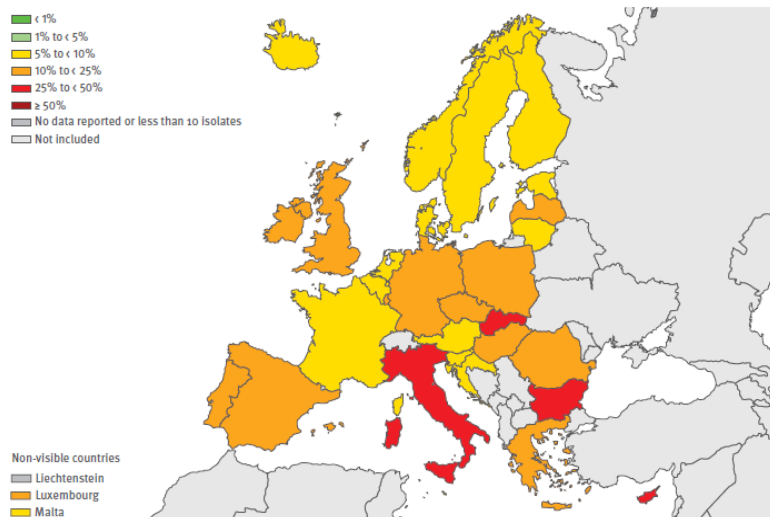
---

<sup>1</sup> Región de Vigilancia de la OMS: África, America, mediterránea oriental, europea, sur este de asia y occidental pacifica.



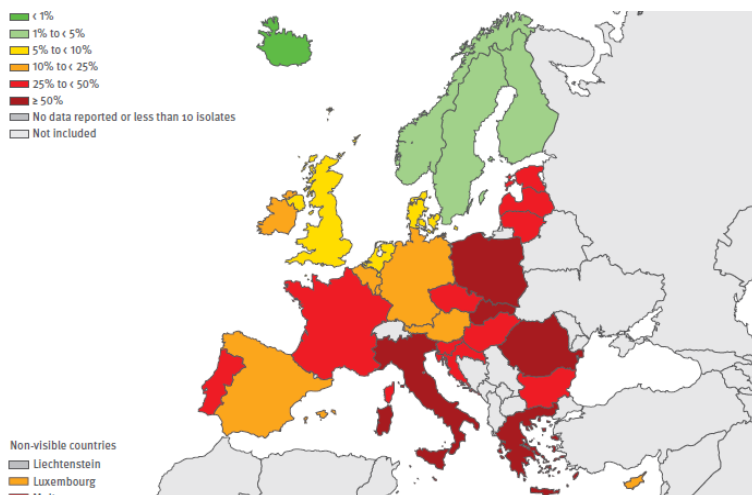


**Figura 2: Porcentaje de resistencia a CTG reportados en aislamientos de *E. coli* invasivos por la EARSS 2013**



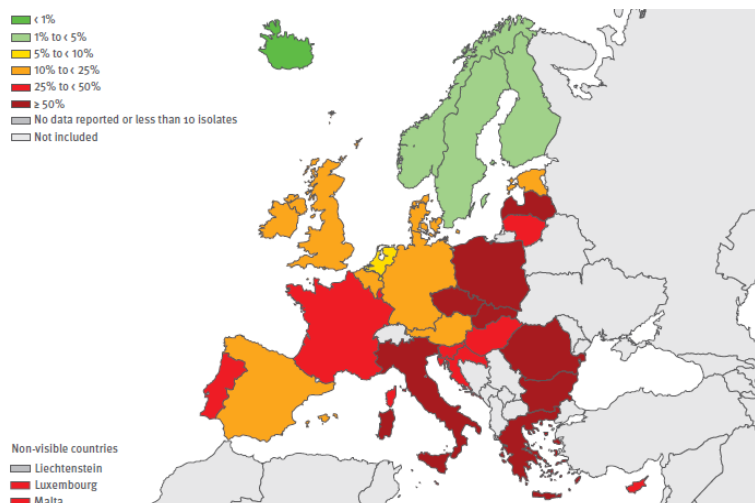
Los colores indican el porcentaje de resistencia para cada una de las regiones. La figura fue extraída del Informe de vigilancia de resistencia antimicrobiana en Europa 2013 (14).

**Figura 3: Porcentaje de resistencia a fluoroquinolonas en aislamientos invasivos de *K. pneumoniae* reportados por EARSS 2013**



Los colores indican el porcentaje de resistencia para cada una de las regiones. La figura fue extraída del Informe de vigilancia de resistencia antimicrobiana en Europa 2013 (14)

**Figura 4: Porcentaje de resistencia en aislamientos invasivos de *K. pneumoniae* a CTG, reportados por EARSS 2013**



Los colores indican el porcentaje de resistencia para cada una de las regiones. La figura fue extraída del Informe de vigilancia de resistencia antimicrobiana en Europa 2013 (14)

Se estima que en Europa las bacterias multirresistentes<sup>2</sup> causan cerca de 400.000 infecciones al año y al menos 25.000 muertes, lo que genera costos en salud cercanos a 1.5 billones de euros anuales (15).

Para los países de América del Sur, el informe anual del año 2008 de la red de vigilancia y monitoreo de resistencia bacteriana (Red WHONET), reporta porcentajes de resistencia mayores al 30 % para el ácido nalidíxico (NAL) y ciprofloxacina (CIP) en ambas especies (Tabla 1)(16).

Estudios realizados en Latinoamérica muestran la endemidad de infecciones causados por clones bacterianos multiresistentes, en forma intermitente y el predominio de bacterias patógenas productora de BLEE en unidades de cuidado intensivo de pediatría, en infecciones hospitalarias y en infecciones asociadas a la comunidad (17-21) cuyo fenotipo muchas veces incluye la resistencia a otro tipo de antibióticos como los aminoglicósidos, tetraciclinas, sulfonamidas, y fluoroquinolonas, los cuales pueden ser encontrados en la misma plataforma genética (22).

Existen aun limitaciones en la información de vigilancia en muchos de los países de Sudamérica y posiblemente un subregistro de datos, ya que no se encuentran datos completos y actualizados, como si ocurre con otros de los sistemas de vigilancia de resistencia como EARSS.

<sup>2</sup> Definido como resistente a tres o más familias de antimicrobianos.

**Tabla 1 Niveles de Sensibilidad a quinolonas**

País	NAL S (%)		CIP S (%)	
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Argentina	41	41	62	48
Bolivia	26	NR	NR	55
Ecuador	40	47	47	54
Paraguay	61	34	67	46
Perú	25	28	38	44
Uruguay	NR	NR	68,4	46
Venezuela	46	55	60,3	70

Reportes de niveles de sensibilidad a ácido nalidíxico (NAL) y ciprofloxacina (CIP) en aislamientos hospitalarios en países de América del Sur (Año 2008). S (%): porcentaje de sensibilidad, NR: No reporta. Brasil, Chile y Colombia no reportan datos. Datos tomados del informe de la red de monitoreo y vigilancia de la resistencia a los antibióticos 2008 (16).

## 1.2.1 Mecanismos de Resistencia a $\beta$ -lactámicos y Quinolonas.

### 1.2.1.1 $\beta$ -Lactamasas.

Los  $\beta$ -lactámicos son antibióticos bactericidas, ampliamente usados en clínica que incluyen penicilinas, cefalosporina, monobactámicos y carbapenemes (23).

La resistencia a  $\beta$ -lactámicos esta dado por diferentes mecanismos, siendo la producción de  $\beta$ -lactamasas uno de los principales mecanismos de resistencia, se considera que estas enzimas son las responsables ya sea en forma directa o indirecta, de la multiresistencia en bacilos gram negativos (25, 26)

Los genes para estas enzimas pueden estar codificados en el cromosoma o en plásmidos y pueden producirse de forma constitutiva o inducible muchas de las  $\beta$ -lactamasas se encuentran asociadas a elementos genéticos movilizables asociados a la disminución de la sensibilidad a muchos de los antimicrobianos de uso clínico incluidos los aminoglicósidos, las tetraciclinas y las fluoroquinolonas (24).

Existen más de 1000  $\beta$ -lactamasas descritas, las cuales se encuentran agrupadas en grupos, de los cuales cabe destacar: las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (grupos<sup>3</sup> 2be, 2ber y 2de: enzimas tipo TEM,

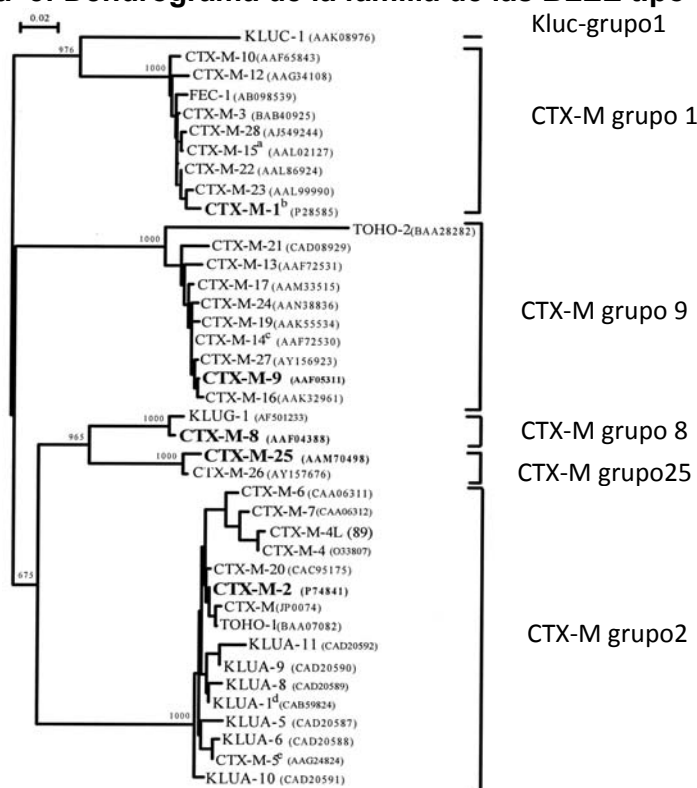
<sup>3</sup> Clasificación según Bush y Jacoby.

SHV, CTX-M y OXA), las  $\beta$ -lactamasas resistente a los inhibidores (grupo 2br, TEM y SHV),  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC (grupo 1) y las carbapenemasas (grupos 2f, 2df y 3) (25).

Las BLEE se definen como enzimas capaces de hidrolizar las penicilinas, las cefalosporinas (excepto las cefamicinas) y los monobactámicos, estas enzimas no tienen acción sobre los carbapenemes y se caracterizan por ser inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (24).

La primera BLEE descrita, fue la enzima SHV2 en Alemania en 1983, seguida de TEM-3 en Francia y de CTX-M1. Las enzimas de tipo CTX-M adquirieron su nombre debido a la capacidad hidrolítica preferente por cefotaxima. Este grupo de enzimas presentan una gran relevancia epidemiológica debido al éxito que presentan en su dispersión posiblemente debido a su asociación a elementos móviles (26, 27). En la Figura 5 se observa el dendrograma reducido de esta familia.

**Figura 5: Dendrograma de la familia de las BLEE tipo CTX-M**



La escala de los brazos está diagramada de acuerdo a los cambios aminoacídicos. La figura fue extraída y modificada :Bonnet *et al.*(27)

Las  $\beta$ -lactamasas resistentes a inhibidores, se caracterizan por conferir resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, donde los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas no tienen acción sobre las mismas. (24).

Si bien la primera  $\beta$ -lactamasa de tipo AmpC fue encontrada en el cromosoma de una *E. coli* es en otras enterobacterias que pueden regular

su nivel de expresión (y por mutaciones en el sistema de regulación, desreprimirlas) donde son un problema relevante. Mas recientemente, los genes codificantes de estas enzimas fueron encontrados en plásmidos, con capacidad de ser movilizados a bacterias que no producían estas enzimas en forma natural (24, 26).

Se caracterizan por su actividad de cefalosporinasa, hidrolizando cefalosporinas de primera y segunda generación incluyendo las cefamicinas y en menor medida las de tercera generación, siendo muy poco eficaces con las de cuarta generación y los carbapenemicos. La cloxacilina, el aztreonam y el ácido borónico inhiben las enzimas de tipo AmpC, mientras no son inhibidas por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (24).

Los genes de las enzimas de tipo AmpC codificadas en plásmidos, se agruparon en seis diferentes familias de acuerdo al origen cromosómico así CIT, derivadas de *C. freundii*, DHA derivadas de *M. morgani*, ACC, relacionado con *Hafnia alvei*, FOX, derivada de *Aeromonas media*, MOX, derivada de *Aeromonas caviae* y EBC derivadas de *E. cloacae* y/o *E. asburiae* (24).

Por último se encuentran las carbapenemasas, que son  $\beta$ -lactamasas capaces de hidrolizar carbapenemicos, las cuales presentan patrones de resistencia particulares, dependiendo de la especie en que se encuentre presente y de la propia enzima codificada. Este grupo incluye tanto serinoenzimas como metaloenzimas y su transmisión se encuentra asociada a elementos móviles (24).

#### 1.2.1.2 Quinolonas y Fluoquinolonas

Las quinolonas (especialmente las fluoroquinolonas) son agentes antibacterianos de amplio espectro, de origen sintético, con rápida actividad bactericida, baja toxicidad, bajo costo y de fácil administración (28, 29); estos agentes tienen como blanco dos topoisomerasas bacterianas, y pueden ser de elección utilizados en el tratamiento de infecciones severas tanto adquiridas en la comunidad como de origen hospitalario, especialmente en infecciones causadas por bacterias resistentes a otros grupos de antibióticos (28).

El crecimiento de su prescripción y el mal manejo de este tipo de antibacterianos, ha conllevado al incremento y a la diseminación de patógenos resistentes a quinolonas (28).

Las quinolonas estructuralmente son un grupo de agentes antimicrobianos con un núcleo común denominado 4-quinolona, derivados de una preparación comercial de cloroquina (30, 31). El ácido nalidíxico fue la primera quinolona de uso clínico, descubierta en 1962, la cual, fue ampliamente usada en el tratamiento de infecciones urinarias (32, 33).

En 1980, modificaciones químicas de la estructura básica de las quinolonas, dieron origen a las fluoroquinolonas, generadas por la adición de uno o más átomos de flúor (33), apareciendo las quinolonas de

primera, segunda, tercera, cuarta generación y las desfluoroquinolonas, estos cambios van ampliando su espectro antibacteriano contra bacterias aeróbicas y anaeróbicas tanto gram positivas como gram negativas(30).

Como ejemplo, la ciprofloxacina es una de las fluoroquinolonas más utilizadas a nivel mundial y está indicada en el tratamiento de bacterias gram negativas, especialmente, de vías urinarias (29, 30).

#### 1.2.1.3 Mecanismos de acción de las quinolonas

Las ADN topoisomerasas son enzimas que tienen como función controlar la topología del ADN (34). Durante el proceso de replicación del ADN bacteriano, estas enzimas forman un complejo que permite generar cortes y ligaciones que distienden los superenrollamientos producidos dentro del proceso. Al unirse las quinolonas a estas enzimas, probablemente, antes de la escisión del ADN, se bloquea la replicación y se impide la religación de las hebras de material genético (35, 36).

El proceso de unión de las quinolonas es reversible a bajas concentraciones, pero a altas concentraciones, generan un desequilibrio tal de la estructura, que conlleva a la pérdida del superenrollamiento y a la generación de fragmentos de ADN, con la posterior activación de vías metabólicas que dan como resultado la producción y acumulación de ROS (*Reactive Oxygen Species*) que se asume, son las responsables de generar la actividad bactericida del antimicrobiano (35).

Las quinolonas actúan principalmente sobre la ADN girasa y la topoisomerasa IV. Ambas están constituidas por cuatro subunidades (2 GyrA y 2 GyrB para la ADN girasa ; 2 ParC y 2 ParE para la topoisomerasa IV) (35). En bacterias gram negativas, la ADN girasa es más susceptible a la acción de las quinolonas que la topoisomerasa IV, por ello es considerada el blanco primario (35, 37).

#### 1.2.1.4 Mecanismo de resistencia a quinolonas

##### 1.2.1.4.1 Resistencia Cromosómica

Se han descrito principalmente, dos grupos de mecanismos de resistencia a quinolonas localizados en el cromosoma bacteriano: 1- la alteración del blanco de unión del antimicrobiano y 2- la disminución de la concentración del mismo dentro de la célula (7, 38).

##### 1.2.1.4.1.1 Alteración del sitio de unión:

Como se dijo anteriormente, el principal sitio blanco de las quinolonas son las enzimas ADN girasa y topoisomerasa IV. La ADN girasa es una enzima tetramérica de estructura  $A_2B_2$  (Figura 6) (39).

Los mecanismos de resistencia a quinolonas se dan principalmente por sustituciones aminoacídicas generadas por acumulación de mutaciones en las regiones denominadas QRDR (Región Determinante de Resistencia a Quinolona, localizadas principalmente en *gyrA* y *parC*) que modifican la afinidad de unión de las quinolonas (30, 35, 36, 38).

**Figura 6 : Estructura de la ADN girasa (A2B2)**

A': Región correspondiente a las dos subunidades de GyrA (A2); B': Región correspondiente a las dos subunidades GyrB (B2). QRDR: de sus siglas en inglés *Quinolone Resistance Determining Region*, Imagen extraída de Heddle *et al.* (39).

Dentro de las mutaciones que se presentan en forma frecuente, en aislamientos clínicos de *E. coli*, se encuentran los cambios en las posiciones aminoacídicas 83 y 87 de GyrA; donde por ejemplo el cambio de serina en la posición 83 por triptófano (Ser83Trp), puede generar un incremento en la resistencia al ácido nalidíxico en casi 20 veces (39).

En el caso de ParC, en esta misma especie bacteriana, los cambios mas frecuentes se encuentran en las posiciones 80 y 84 (38). La acumulación de mutaciones tanto en *gyrA*, como *parC* generan aislamientos con un alto nivel de resistencia a fluoroquinolonas y son homólogas en diferentes especies bacterianas (42, 43).

Las alteraciones en GyrB se presentan en menor frecuencia que las de GyrA (7, 38). Las mutaciones de GyrB que generan resistencia en *E. coli* se dan en las posiciones 426 (Asp426Asn) y 447 (Lys447Glu), donde la primera sustitución parece conferir resistencia a todas las quinolonas, mientras la segunda sólo confiere un mayor nivel de resistencia a ácido nalidíxico pero una mayor susceptibilidad a las fluoroquinolonas (7).

Por último, gen *parE*, posee una gran similitud con *gyrB*. Las mutaciones en este gen (Leu445 a His), se presentan en baja frecuencia y se ha demostrado que para que afecte la susceptibilidad a quinolonas, se hace necesario presentar mutaciones simultáneas en *gyrA* (40, 41).

#### 1.2.1.4.1.2 Disminución de la concentración del antibacteriano:

Los otros mecanismos que involucran la resistencia a quinolonas son: la sobreexpresión de las bombas de expulsión y la impermeabilidad de membrana, ya sea por la ausencia de porinas o por las mutaciones en genes que regulan su expresión (38).



Las bombas de expulsión están involucradas en la resistencia intrínseca de muchos microorganismos y se ha determinado que tres de los transportadores en *E. coli* (AcrAB-TolC, MdfA, y NorE) pueden alterar por sí mismos, la concentración inhibitoria mínima (CIM) a quinolonas, por lo que su sobreexpresión, puede ser necesaria; para el desallorjo temprano de bajos niveles de resistencia, lo que generaría posteriormente un alto nivel de resistencia debido a la selección de mutaciones en *gyrA* (42).

La pérdida de porinas o la expresión alterada de las mismas pueden ser el resultado de mutaciones y/o deleciones que alteran la expresión de los genes que las codifican. Del mismo modo, estos cambios incrementan los niveles de la resistencia (7).

#### 1.2.1.4.2 Mecanismos de resistencia a quinolonas codificadas en plásmidos

No hay que olvidar que las quinolonas son antibióticos dependientes de la concentración y presentan un coeficiente inhibitorio alto (CI=Concentración Máxima sérica/CMI), Por ello deberían dosificarse con un CI entre 8 y 10 para prevenir la selección de mutantes (43)

La selección de mutantes ocurre en lo que se denomina ventana de selección de mutantes esta zona se encuentra comprendida entre la CMI y la concentración preventiva de mutantes donde las bacterias resistentes pueden ser seleccionadas bajo exposición antimicrobiana. o dicho de otra forma la ventana selectiva de mutantes comprende diferentes rangos de concentraciones de antibiótico donde las bacterias resistentes pueden ser seleccionadas bajo fuerzas selectivas antimicrobianas (44).

Los PMQR incrementan la probabilidad de que los aislamientos antes dentro de la ventana selectiva de mutantes y esto parece facilitar la selección de mutantes resistentes (44)

En sus inicios se creyó que la resistencia a estas drogas, no podría darse de forma transferible, por lo que la resistencia a quinolonas sólo se pensó por alteración en los sitios diana, ya que estos antimicrobianos son de origen sintético y por ello, se excluyó conceptualmente la existencia genes de resistencia a estas drogas en microorganismos ambientales (45).

En 1998 se informó la caracterización del primer determinante de resistencia a quinolonas codificado en un plasmido (PMQR) en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* (46) .

El gen fue denominado *qnr* derivado del término en inglés "quinolone resistance"(46). Actualmente, se reconocen han descrito seis familias de estos genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS* *qnrD* y *qnrVC*); y se ha encontrado identidad de estos genes, con genes cromosomales de los cuales podrían haberse originado (8).

Además de los genes *qnr* que se han descrito otros determinantes PMQR: como los codificantes para bombas de eflujo (*qepA* y *oqxAB*), y la variante de una enzima inactivante de aminoglicósidos (N-

acetiltransferasa) que adicionalmente a este grupo de antibióticos acetyla algunas de las fluoroquinolonas (*aac(6')-Ib-cr*). Estos genes proporcionan mecanismos que inducen un bajo nivel de resistencia, pero que pueden ser pasos iniciales e importantes en la obtención de mayores niveles de resistencia (7, 8).

#### 1.2.1.4.2.1 *qnrA*

El primer mecanismo PMQR fue detectado en un plásmido de una *K. pneumoniae* de origen urinario (8, 46); este plásmido (pMG252) presentaba una  $\beta$ -lactamasa del tipo FOX-5, y un gen que confería cierto nivel de resistencia a quinolonas, este gen fue denominado originalmente *qnr* y renombrado finalmente, como *qnrA1* debido a la aparición de nuevos alelos (8).

Los genes *qnrA* codifican para proteínas de 218 aminoácidos que pertenecen a la familia de pentapéptidos repetidos. Este gen presenta siete variantes alélicas diferentes denominadas *qnrA1* a *qnrA7* (<http://www.lahey.org/qnrStudies> - 13 de enero del 2015).

QnrA confiere un bajo nivel de resistencia por sí misma. *In vitro* ha demostrado proteger la ADN girasa y la topoisomerasa IV por reducción del número de sitios blanco del complejo enzima-ADN (bacteriano), aunque también se sugiere que podría actuar imitando el ADN y así competir con por la unión a la girasa (48, 49).

#### 1.2.1.4.2.2 *qnrS*

El gen *qnrS* fue detectado en el 2003 en *Shigella flexneri* 2b causante de una epidemia de enterocolitis en Japón, donde una de las cepas del clon presentó resistencia a fluoroquinolonas y presentó un plásmido conjugativo que transfería la resistencia a quinolonas. (10, 50). Es probable que *Vibrio splendidus* sea el reservorio ambiental del gen *qnrS* (47).

El gen *qnrS* codifica para una proteína de 218 aminoácidos de la familia de pentapéptidos repetidos (denominado QnrS1), que comparte un 59 % de identidad con los aminoácidos de QnrA1(8). Posteriormente se reportaron 8 variantes (*qnrS1* a *qnrS9*) (<http://www.lahey.org/qnrStudies> - 13 de enero del 2015).

#### 1.2.1.4.2.3 *qnrB*

El gen *qnrB* fue descubierto en un plásmido codificante para CTX-M-15 en aislamientos de *K. pneumoniae*, provenientes del sur de la India (48). Su origen se asocia a *Citrobacter* spp.(49).

El gen renombrado como *qnrB1*, codifica para una proteína de 214 aminoácidos de la familia de pentapéptidos repetidos, que comparte un 43 % de identidad con QnrA y un 44 % con QnrS. El gen *qnrB* es el determinante más frecuentemente encontrado de la familias de *qnr* descritas hasta al momento, además de ser el que posee el mayor número de variantes alélicas (*qnrB1* a *qnrB80* según base de datos <http://www.lahey.org/qnrStudies>, actualizada 13 de enero del 2015)(7, 8).

#### 1.2.1.4.2.4 *qnrC*

El gen *qnrC* fue detectado en una cepa de *Proteus mirabilis* de Shanghai, el cual se diferencia en más de un 30 % con las otras familias de genes del tipo *qnr* (50), este gen codifica para una proteína de 221 aminoácidos de la familia de pentapéptidos repetidos, que comparte un 64 % de identidad con QnrA1, un 41 % con QnrB1, un 59 % con QnrS1 y 43 % con QnrD; hasta el momento solo existe un único alelo (7, 8).

Igual que los otros determinantes del tipo *qnr*, QnrC provee un bajo nivel de resistencia a quinolonas. El gen correspondiente a esta proteína muestra un alto porcentaje de similitud con genes cromosomales de especies ambientales de la familia *Vibrionaceae*, el cual se sospecha podría ser su origen (50).

#### 1.2.1.4.2.5 *qnrD*

El gen *qnrD* fue descubierto en un aislamiento de *Salmonella enterica* serovar Bovismorbificans que portaba un plásmido de 4,3 Kb. Este hallazgo se realizó en el año 2009 en una provincia de China. Este gen codifica para una proteína de 214 aminoácidos de la familia de pentapéptidos y muestra una identidad del 48 % con *qnrA1*, del 61 % con *qnrB1* y del 32 % con *qnrS1* (9, 10, 55); este determinante presenta dos variantes alélicas (<http://www.lahey.org/qnrStudies>, actualizada 13 de enero del 2015).

Este gen ha sido reportado en distintas especies de enterobacterias como *E. coli* de origen animal (56), y *Proteus mirabilis* (51) entre otros.

#### 1.2.1.4.2.6 *qnrVC*

Los *qnrVC* son genes similares a los *qnr* que poseen sitios attC, los cuales están ausentes en los otros *qnr*; en su mayoría estos genes se encuentran localizados en el cromosoma, en elementos móviles conjugativos integrativos (58, 59) y algunos han sido descritos en plásmidos (60). Existen hasta ahora 7 alelos reportados (*qnrVC1-qnrVC7*), según base de datos <http://www.lahey.org/qnrStudies> (actualizada 13 de enero del 2015).

#### 1.2.1.4.2.7 *qepA*

La bomba de eflujo QepA (“*quinolone efflux pump*”) fue identificada y reportada en el 2002 en un aislamiento de *E. coli* recuperado de una muestra de orina en Japón. QepA es una proteína de 511 aminoácidos y pertenece a las bombas de tipo MFS (“*major facilitator superfamily*”) con 14 fragmentos transmembrana (61, 62). El origen de este gen podría encontrarse en la familia de *Actinomycetales*, el gen comparte con esta familia el alto contenido de G+C (72%) (7, 8)

QepA posee dos variantes; ambas confieren una notable disminución en la sensibilidad a las quinolonas hidrofílicas como ciprofloxacina,

enrofloxacin y norfloxacin (52); su prevalencia alrededor del mundo es aún baja en aislamientos humanos, y son escasos los reportes en América Latina.

#### 1.2.1.4.2.8 *OqxAB*

La detección de la bomba de expulsión *OqxAB*, se produjo en una cepa de *E. coli* aislada de estiércol de cerdo (53). Los genes que la codifican (*oqxA* y *oqxB*) se encontraron en un plásmido conjugativo de 52 kb denominado pOLA52. Esta bomba no sólo genera resistencia a quinolonas sino también a  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, novobiocina, tetraciclinas, trimetoprima y sulfametoxazol. (53).

La prevalencia de esta bomba de expulsión en aislamientos clínicos es muy baja, pero en aislamientos animales es mucho más frecuente probablemente por el uso de Olaquinox (una quinolona), en el proceso de engorde de animales.

Los genes de *oqxAB* se han detectado en el cromosoma de *K. pneumoniae*, especie de la cual se cree que fue su reclutado y movilizado por el transposon Tn6010 (7, 8).

#### 1.2.1.4.2.9 *aac (6')-Ib-cr*.

En el año 2003 se describió la enzima AAC(6')-Ib-cr, un nuevo mecanismo de resistencia a quinolonas mediado por plásmidos el cual involucra una variante alélica de la enzima modificadora de aminoglicósidos acetiltransferasa (6')-Ib (54).

AAC(6')-I fue descubierta en 1986, momento desde el cual comenzaron a describirse nuevas variantes, Esta enzima se convirtió en la mas prevalente enzima modificadora de aminoglicósidos, la cual confiere resistencia a TOB, K y AMK. (55) .

La variante, denominada *aac (6')-Ib-cr*, fue descubierta en una cepa de *E. coli* en Shanghai y se caracteriza por las sustituciones Trp102Arg y Asp179Tyr, las cuales no fueron encontradas en otras de las variantes de la enzima estas modificaciones hicieron de esta, una enzima bifuncional(55) que ademas de modificar a los aminoglicósidos antes mencionados, tiene la habilidad de acetilar las fluoroquinolonas, que como la ciprofloxacina y la norfloxacina, albergan un grupo piperazinyl sin sustituir, generando así un bajo nivel de resistencia (7, 8).

### 1.3 Elementos de transferencia de genes PMQR.

Como su nombre lo indica el primer elemento de transferencia de los PMQR son los plásmidos. Los plásmidos son fragmentos de ADN, extracromosomales que son capaces de replicarse por ellos mismos en la célula hospedera (56)

Los plásmidos se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes bacterias e incrementan la diversidad genética mediante la adquisición y la perdida de genes (56) y pueden ser transferidos horizontalmente a las

diferentes poblaciones bacterianas mediante conjugación o movilización(57).

Los plásmidos contienen genes esenciales para la iniciación y el control de procesos de replicación y genes accesorios que pueden llegar a ser útiles tales como los genes de resistencia y/o de virulencia (56).

Muchos de los plásmidos codifican adicionalmente para un sistema toxina- antitoxina que estabiliza el plásmido en la célula, ya que pueden eliminar a las células hijas que no lo adquieran durante la división celular (58).

Los plásmidos en los que se han encontrado genes de resistencia a quinolonas varían en su tamaño desde 2,7 Kb a 320 Kb(7) , que pertenecen a diferentes grupos de incompatibilidad (A/C, HI2, FII, L/M, N, R, Q, U, FI, X1) (8)

Los grupos de incompatibilidad (Inc), fueron asignados a los plásmidos en base a su habilidad para co-existir en la misma célula, este es un indicador de similitud en los módulos de replicación y/o partición en plásmidos que comparten el mismo Inc y de diferencia con los que pertenecen a otros grupos, aunque fueron encontrados varias excepciones (59)

Diferentes técnicas fueron desarrolladas para determinar el grupo Inc, como la introducción de un plásmido desconocido, con un plásmido conocido en una misma célula, ya sea por conjugación o transformación por lo que el resultado dependía de la estabilidad de los mismos en la progenie de la célula. Posteriormente se desarrollaron técnicas de hibridización y en 2005 Carattoli *et al* (56) desarrollaron 5 PCR multiplex y 3 simples, basados en la tipificación del replicón (Inc/rep PCR ó *PBRT*), que permitía caracterizar la mayor parte de los grupos Inc de *Enterobacteriaceae*.(56)

*PBRT* reconoce los replicones de los grupos FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iy, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, FIIA y F donde esta última reconoce un grupo heterogéneo como FI, FII, FIII, FIV, FV y FVI (56). A veces los plásmidos pueden llevar mas de un replicón o pueden presentar secuencias mosaico en algunos de los replicones de enterobacterias.(58)

Igualmente, para algunos de los grupos de Inc (IncN, IncHI2, IncI1 e IncF) también se puede caracterizar por *Plasmid Multilocus Sequence Typing* (*pMLST*), permitiendo una caracterización mas específica, de una manera sencilla y rápida.(60) (www. <http://pubmlst.org/plasmid/>, consultado 13 de enero 2015). El mejor método y más exacto de caracterizar un plásmido sigue siendo su secuenciación y ensamblado completo(58).

Varios de los genes de resistencia a quinolonas como *qnrA1*, se encuentra localizado en un integrón complejo clase 1, donde en la parte superior se encuentran genes tipo *qacEΔ1<sup>4</sup>-sul<sup>5</sup>1*, los cuales usualmente

<sup>4</sup> Gen que confiere resistencia a compuestos de amonio cuaternario, forma trucada de *qacE*

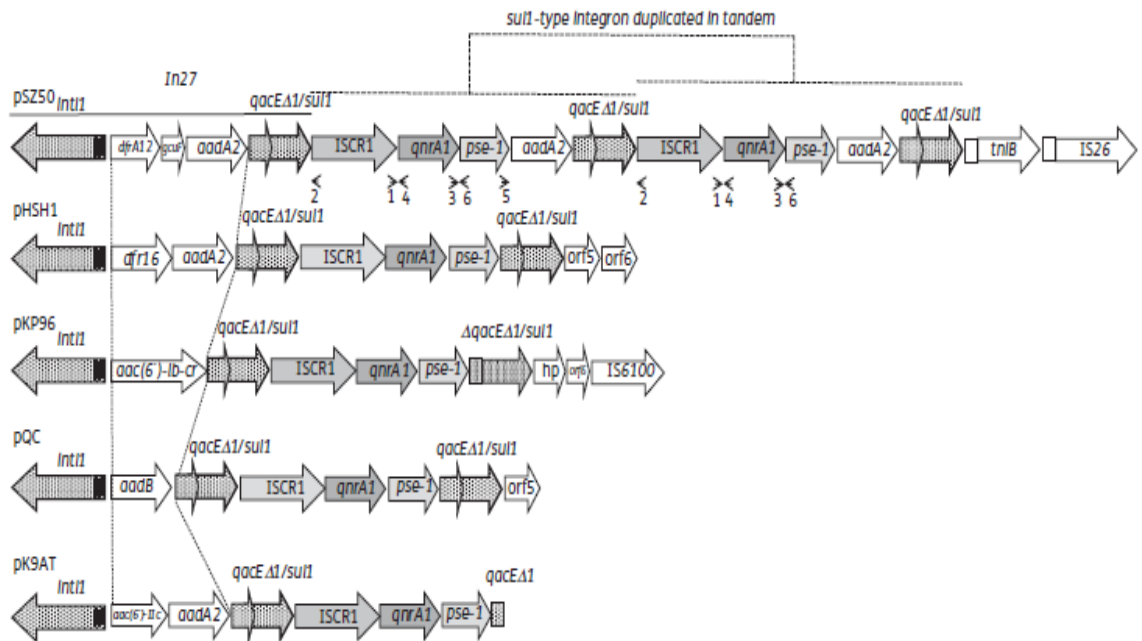
<sup>5</sup> Gen que confiere resistencia a sulfonamidas.

están asociados a *ISCR1* (antes *orf513*), *qnrA* se puede encontrar en la parte inferior del gen o entre genes *ISCR1* (Figura 7) aunque no siempre está presente *ISCR1* como lo reportó tanto el estudio de Corea (72), como en otros estudios de *qnrA* (7, 8, 61, 62).

El gen *qnrB* también se ha asociado a *ISCR1* y a Orf1005 (61), este gen se ha encontrado en el cromosoma *Citrobacter* spp en ausencia de recombinasa o integrasas, se cree que su origen podría darse en alguna de las especies de este género. Mas aun *qnrB4*, ha sido encontrado en plásmidos conjugativos asociados a *ISCR1* o *Int1*, presentando fragmentos extras de ADN que aparentemente no son codificantes pero que si presentan homología con regiones linderas en el genoma de *Citrobacter* spp.(53)

En Argentina, anteriormente a este trabajo se reportó el alelo *qnrB10* asociado a *ISCR1* en integrones complejos clase I (*In37::ISCR1::qnrB10* / *In131::ISCR1::qnrB10*) que llevaban adicionalmente el gen *aac(6')-Ib-cr* en una estructura genética similar a la ya descrita en aislamientos de China y Francia con *qnrA1* y *qnrB4* (75)

Figura 7: Representación esquemática de genes en casete con *qnrA*



Las flechas punteadas corresponden a los genes dentro de las regiones conservadas 5' y 3' del integron tipo *sul1*. Las flechas blancas muestran las regiones variables del integron clase 1, así como los genes variables del integron tipo *sul1*. Los genes del conjunto de genes de *ISCR1* *qnrA1* y *pse-1* están presentes en el integron clase 1 y se encuentran flanqueados por una segunda copia de la región conservada 3' (*qacED1-sul-1*). >, <: Indican el inicio de los primers utilizados para determinar la duplicación en tandem del integron tipo *sul-1*, *hp*: proteína hipotética.

pSZ50, pHSH1, pKP96, pQC, pK9AT, son plásmidos en los cuales se ha determinado el entorno de *qnrA1*. Figura extraída de: Garza-Ramos *et al.* (74)

ISCR1 también está frecuentemente asociado a *qnrB6*, *qnrB2* y *qnrB19*, aunque este último ha sido encontrado en plásmidos, en un transposon (Tn2012) asociado a *ISEcp1* (76)

A diferencia de los genes anteriores, la mayoría de *qnrS* se ha encontrado en plásmidos no conjugativos, pequeños, no asociados a ISCR1 o a integrones complejos, sin genes de resistencia acompañantes, en uno de los plásmidos secuenciados se encontró una estructura similar a Tn3, la cual podría ser la responsable de su movilización y una secuencia de inserción *ISEcl2* (7)

Los genes *qnrC*, *qnrD*, *qnrVC* y *aac(6')-Ib-cr*, también se encuentran como genes en asociados *Int1*(7)

El gen *qnrD* se ha encontrado en plásmidos pequeños que contienen genes *mob* que permiten su movilización, adicionalmente *qnrD* se ha descrito en estructuras denominadas mic (casete de inserción móvil) (63).

Una de las hipótesis que se maneja frente al origen de *qnrD* es que podría ser encontrado en el ADN cromosomal, de una especie de la tribu *Proteeae* y que es el producto de la recombinación con *P. vermicula*, dando origen al plásmido pequeño inicialmente no transmisible que contiene el gen de *qnrD*. (63-65),

OqxAB ha sido generalmente detectado en plásmidos conjugativos flanqueado por secuencias de inserción similares a IS26 formando parte de un transposon compuesto (Tn6010)(79)

QepA se ha encontrado en plásmidos de tipo IncF, principalmente IncFII con módulos de genes de resistencia, y secuencias de inserción completas o truncadas y transposones, donde procesos complejos de movilización permiten la transferencia de este gen, donde las secuencias de inserción, (principalmente IS26 y ISCR3) juegan un papel importante (Figura 8)(80).

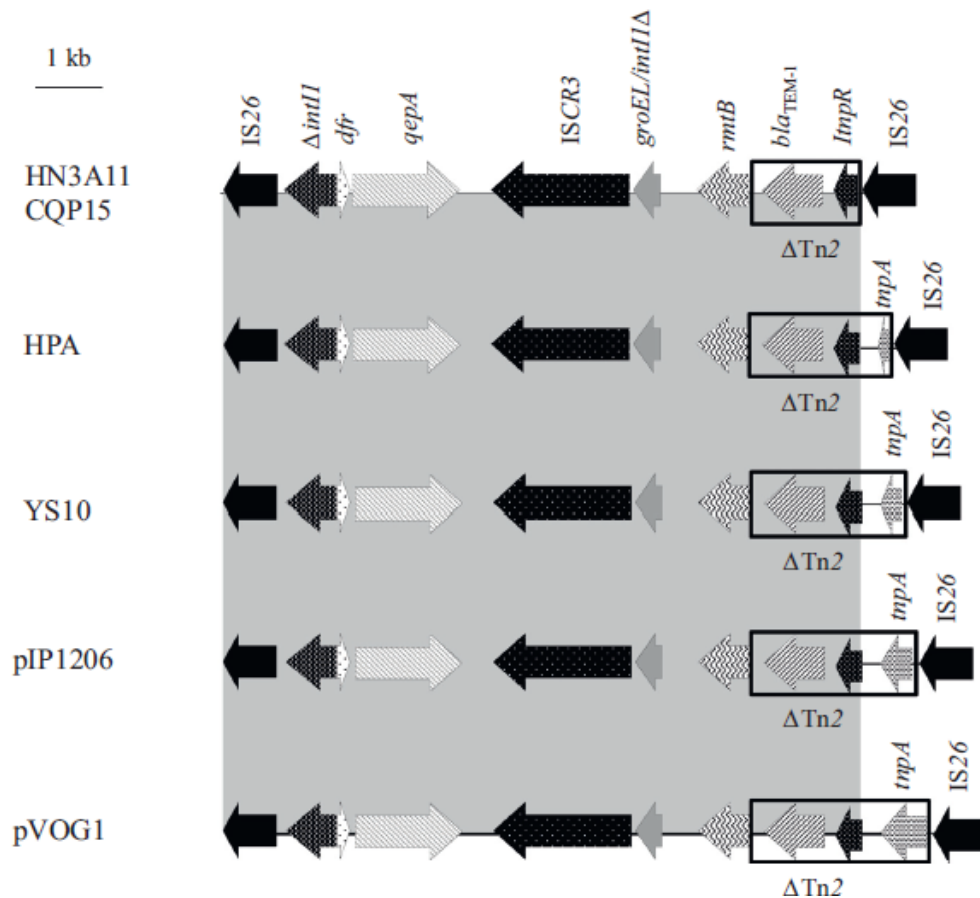
Recordemos que los integrones son elementos dinámicos que contienen los determinantes genéticos de un sistema de recombinación específica del sitio que reconocen y capturan genes en casete móviles; su estructura incluye a *intI*, que es el gen para la integrasa, *attI*, que es el sitio de recombinación y al menos un promotor (Pc, P2). La Figura 9 muestra la estructura básica de un integron

Los integrones de resistencia han sido (a fin de facilitar la comprensión de su complejidad) clasificados en cuatro grupos (*intI1*, *intI2*, *intI3* e *intI4*) dependiendo de la homología de las integrasas de las integrasas los integrones de clase 1 son los más frecuentes en aislamientos de origen clínico, se caracterizan por presentar dos segmentos conservados, el fragmento conservado 5' (5'CS, que contiene a *intI* y *attI*) y el fragmento conservado 3' (3'CS que contiene a *intI* y *qacEΔ1*). (66)

Los integrones pueden contener genes en casete definidos como unidades discretas de un fragmento abierto de lectura, seguido de un sitio de recombinación denominado *attC*. Los casetes no son móviles por si mismos pero pueden ser movilizados por la integrasa, existen tanto en forma libre como en forma circular covalente cerrada, estos confieren resistencia a muchos de los antibióticos y presentan diferentes tipos de arreglos de los mismos, (66)

Los transposones en cambio son elementos genéticos móviles, los cuales codifican la maquinaria necesaria para promover por si mismos el proceso de translocación, ya que la recombinasa codificasa permite la movilidad de la plataforma como tal. Algunos transposones están frecuentemente asociados a la movilidad de integrones particulares (66)

**Figura 8: Contexto genético de *qepA***

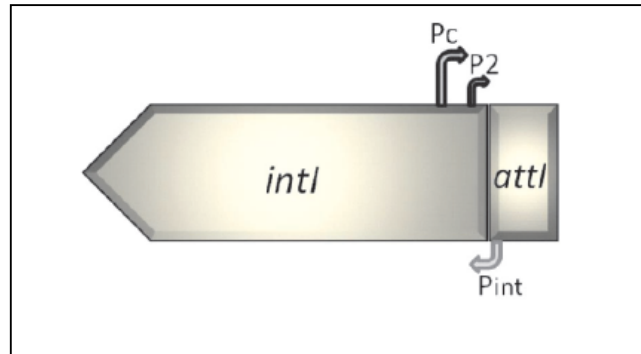


Las flechas indican las secuencias codificantes  $\Delta int1$ : indica gen incompleto de la integrasa 1, *tnpA*: transposasa de IS26,  $\Delta Tn2$ : transposon2 incompleto. Las regiones con 99% de homología se encuentran sombreadas en gris, HN3A11, CQP15, HPA, YS10, pIP1206, pVOG1, son secuencias depositadas en Genbank que contienen el gen *qepA*. Figura extraída de: Chen *et al.* (80)



Los elementos *mic* son similares a transposones, reteniendo entre dos elementos repetidos invertidos que han perdido en sucesivos rearrreglos los genes para las transposasas. Las duplicaciones de sitios blancos son marcadoras de los eventos de transposición. (64).

**Figura 9: Estructura básica de un integrón**



Se observan los componentes básicos de la estructura de un integrón, *intI*: gen que codifica para la integrasa, *attI*, sitio de recombinación y  $P_c$ ,  $P_2$  y  $P_{int}$ : posibles promotores presentes, siendo  $P_{int}$  el promotor de la integrasa. Figura extraída de ; Integrones: Di Conza *et al* (67)

# Objetivos

---



## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

- Caracterizar los determinantes de resistencia a quinolonas en aislamientos clínicos de enterobacterias con énfasis en aquellos mecanismos de localización plasmídica.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analizar el perfil fenotípico de resistencia a quinolonas y otros antimicrobianos en aislamientos clínicos, pertenecientes a las *Enterobacteriaceae* de distintos países de Sudamérica como Argentina, Perú y Colombia.
- Caracterizar los determinantes de resistencia a quinolonas localizadas en plásmidos, (PMQR) en los aislamientos estudiados y evaluar la prevalencia de los distintos determinantes PMQR dentro de la población portadora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).
- Determinar las mutaciones presentes en los genes *gyrA* y *parC* en la Región Determinante de Resistencia a Quinolona (QRDR) en los aislamientos de interés.
- Analizar el entorno de los genes de tipo PMQR en aquellos marcadores que no se hayan detectado previamente en Sudamérica.
- Tipificar los aislamientos relevantes mediante la determinación de diferentes marcadores de clonalidad.
- Caracterizar los plásmidos de interés mediante la determinación de los tamaños moleculares, el estudio de su transferibilidad y grupo de incompatibilidad.



# **Materiales y Métodos**

---



### 3.0 MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 Aislamientos Bacterianos:

Se estudiaron tres grupos bacterianos, que forman parte de la colección de cepas del laboratorio de resistencia bacteriana, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Los aislamientos clínicos provienen de tres países Sudamericanos, pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y son descritos a continuación.

##### 3.1.1 Aislamientos de Argentina

Se analizaron para PMQR 57<sup>6</sup> aislamientos, resistentes a cefalosporinas de tercera generación, resultantes de un estudio multicéntrico que tenía como objetivo analizar la prevalencia y la naturaleza de las BLEE en Argentina (68).

Dentro de las especies de este grupo se encontraban 23 *K. pneumoniae*, 17 *E. coli*, 6 *P. mirabilis*, 4 *K. oxytoca*, 3 *Serratia* spp., 2 *E. cloacae*, 1 *E. gergoviae* y 1 *Providencia* sp.

Estos aislamientos provienen de un total de 1586 aislamientos clínicos consecutivos, no repetitivos que fueron recolectados durante el mes de octubre del 2010, en hospitales de diferentes regiones de Argentina, 207 de ellos presentaron disminución a la sensibilidad a las cefalosporinas de espectro extendido, 57 de los cuales fueron recolectados en la primera semana de octubre y se catalogaron como muestra representativa.

Los Hospitales que hicieron parte del estudio son: Hospital Británico, Hospital de Clínicas” José de San Martín”, Sanatorio San Martín, Hospital de niños C. de Alassia, Hospital Trelew, Hospital Cullen, Hospital Castex, CEMIC, Hospital Mater, Hospital J.B Iturraspe, Hospital Alemán, Hospital de Rosario y Hospital de Villa Constitución.

Se analizó un aislamiento más, una *E. coli* denominada B2, la cual fue descartada de la población anterior por no presentar resistencia a CTG, pero que igualmente se caracterizó por presentar altos niveles de resistencia a quinolonas.

##### 3.1.2 Aislamientos de Perú

Se incluyeron 27 aislamientos clínicos consecutivos, no repetitivos cuyo criterio de inclusión fue ser resistente a al menos una CTG, Estos fueron recolectados en hospitales del área metropolitana de Lima, durante el año 2011, como parte de un estudio de prevalencia de BLEE en Perú<sup>7,8</sup>.(69)

<sup>6</sup> Se incluyeron 55 aislamientos iniciales y dos aislamientos llegaron posteriormente al laboratorio, hacían parte del mismo estudio y conservaban las características de inclusión del mismo.

<sup>7</sup> No se tienen datos adicionales de esta población.

<sup>8</sup> Los datos de este estudio fueron presentados en ICAAC 2011.



Dentro de las especies de este grupo se encontraban 14 *E. coli*, 11 *K. pneumoniae*, 1 *P. vulgaris* y 1 *Serratia* sp.

### 3.1.3 Aislamientos de Colombia

Se analizaron 55 aislamientos clínicos (38 *E. coli*, 17 *K. pneumoniae*) consecutivos, no repetitivos, seleccionados al azar, durante el periodo del 15 de noviembre al 15 de diciembre del 2012, en un Hospital de Santander, Bucaramanga, Colombia.

### 3.1.4 Aislamientos de laboratorio

Se utilizaron los siguientes aislamientos de laboratorio en los procesos de:

Control de antibiograma: *E. coli* ATCC25922 y *E. coli* 35218

Conjugación: *E. coli* J53 Az<sup>R</sup> (F<sup>-</sup> met<sup>-</sup> pro<sup>-</sup> Azi<sup>R</sup>)

Electroporación:

*E. coli* DH5α (F<sup>-</sup> 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1)

*E. coli* TOP10 (F-) (F<sup>-</sup>mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 λ<sup>-</sup>)

Controles de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>9</sup>:

PMQR: *E. coli* Top10 *qepA*, *E. coli* Top10 *qnrA*, *E. coli* Top10 *qnrB*, *E. coli* Top10 *qnrC*, *E. coli* Top10 *qnrD*.

*aac(6')-Ib*: *Salmonella* Infantis (S21) y *Morganella morganii* (MM16)(70, 71).

*Int1*: *Salmonella* Infantis (S21)(70) .

Factores de virulencia de *K. pneumoniae* (ST23)(72).

Tipificación de plásmidos: *E. coli* DH5α electroporado con plásmidos de cada grupo Inc. FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iγ, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, y FIIA. (Gentilmente cedidos por Pallechi L.)

## 3.2 Identificación Bacteriana

Los aislamientos fueron identificados tanto por pruebas bioquímicas manuales, como automatizadas Vitek (bioMérieux) o Phoenix (Becton Dickinson) dependiendo del origen de las mismas.

## 3.3 Conservación de los microorganismos

Los aislamientos fueron conservados en caldo infusión cerebro corazón (BHI) con glicerol al 20 %, y mantenidos a temperatura de (-20 °C) hasta el momento de su uso. Su recuperación se realizó en agar nutritivo o agar

<sup>9</sup> Controles de *qnrA*, B y S fueron facilitados por el Dr. Nordman, *qnrC* por el Dr. Wang, *qepA* or el Dr. Yamane, y *qnrD* por Fanny González. Universidad de Mérida Venezuela, S21 y MM16 cepas caracterizadas previamente en el laboratorio de resistencia bacteriana FFyB, UBA.

tripticasa soya o BHI con antibiótico que genere un nivel bajo de presión, evitando la pérdida de plásmidos<sup>10</sup>;

### 3.4 Determinación de sensibilidad y detección de mecanismos de resistencia

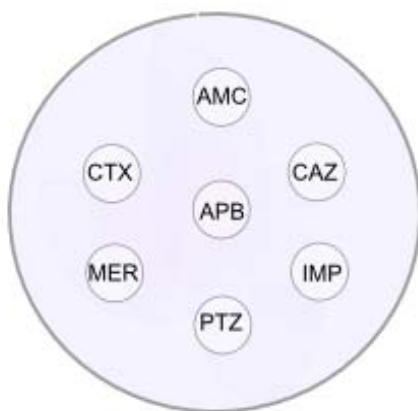
#### 3.4.1 Ensayos de difusión en medio sólido con discos

Los antibiogramas fueron realizados siguiendo las recomendaciones del *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2010, 2012) (73, 74) y de la Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica (SADEBAC-AAM) (11).

Los discos de antibióticos utilizados fueron: ácido nalidixico (NAL), ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LVX), gentamicina (GEN), kanamicina (KAN), Tetraciclina (TET), Amicacina (AMK), trimetoprima/sulfametoxazol (TMS), amoxicilina /ácido clavulánico (AMC), ceftazidima (CAZ), imipenem (IMI), piperacilina/tazobactam (TAZ), meropenem (MER), cefotaxima (CTX) y ácido fenil borónico (APB). Para todos los antibiogramas se utilizaron discos comerciales (Britania) y Agar Mueller-Hinton (Britania).

En la Figura 10 se muestra la disposición estratégica de discos<sup>11</sup> recomendada para la detección de mecanismos de resistencia, la distancia sugerida entre borde y borde de cada disco en de 2,5 a 3 cm (11).

**Figura 10: Disposición de discos sugeridos por SADEBAC-AAM**  
Sinergia



AMC-CTX/CAZ: posible BLEE, que se inhibe por ácido clavulánico. En sinergia positiva se llevo a cabo antibiograma confirmatorio.

CAZ-IMP: Posible presencia tipo carbapenemasas de tipo GES. Si se presenta achatamiento posible AmpC inducible por IMP

APB-CAZ/CTX: Posible AmpC que se inhibe con APB.

APB-IMI/MER: Posible  $\beta$ -lactamasa tipo KPC, que se inhibe por APB.

PTZ-IMP/MER: Posible Carbapenemasa de clase A, que se inhibe por tazobactam.

#### 3.4.2 Concentración inhibitoria mínima

<sup>10</sup> Usualmente se utilizó ampicilina 100  $\mu$ g/ml para los aislamientos con BLEE.

<sup>11</sup> Esta disposición solo se utilizó en los aislamientos de Colombia, para buscar resistencia acompañante o para confirmar algún resultado en los grupos anteriores

Se determinó por dilución en medio sólido o por microdilución siguiendo las recomendaciones del CLSI, a quinolonas y aminoglicósidos: NAL (0,25- 512 µg/ml), CIP (0,006-64 µg/ml), levofloxacin (LVX) (0,25-64 µg/ml), gatifloxacin (GAT) (0,25-64 µg/ml), tobramicin (TOB) (0,5 -64 µg/ml), y GEN (0,5 -64 µg/ml).

### 3.5 Caracterización genotípica de resistencia a quinolonas.

#### 3.5.1 Extracción de ADN Total.

El ADN total se extrajo por ebullición. A partir de aislamientos puros, se colocó una asada de cultivo en 200 µl de agua milliQ estéril, se suspendió y llevó a baño de agua a 95°C durante 20 minutos. Los restos celulares se descartaron por centrifugación a 7000 rpm en una microcentrifuga durante 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo, y se utilizó para la realización de PCRs inmediatamente o se congeló hasta su uso.

#### 3.5.2 Extracción de ADN plasmídico.

La extracción de ADN plasmídico en aislamientos clínicos, se realizó mediante la técnica de extracción con fenol según protocolo de Kado y Liu (75), estos plásmidos fueron desalados y utilizados en la obtención de electroporantes. El protocolo detallado se encuentra en el anexo I.

#### 3.5.3 Determinación de genes por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

##### 3.5.3.1. Identificación de mutaciones *QRDR*.

Los genes *gyrA* y *parC* se amplificaron utilizando *primers* específicos (49).

La concentración de los reactivos utilizados en la mezcla de reacción fue la siguiente: Volumen total 50 µl<sup>12</sup>, ADN 2 µl, *buffer* de reacción KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *Primers* 1 µM, dntp (INBIO) 0,4 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 5 U<sup>13</sup>. Los *primers* y las condiciones de ciclado se encuentran en la Tabla 2.

**Tabla 2: *Primers* y condiciones de amplificación utilizados para la detección de *gyrA* y *parC***

Gen	<i>Primers</i> 5'-3'	Tamaño esperado (pb)	Condiciones de ciclado		
			Pasos	Temperatura	Tiempo
<i>gyrA</i>	F	AAATCTGCCCGTGTTCGTTGGT	1	95	5 min
	R	GCCATACCTACGGCGATACC	2	95	45 s
<i>parC</i>	F	CTGAATGCCAGCGCCAAATT	3	61	45 seg
	R	GCGAACGATTCGGATCGTC	4	72	45 seg
			5	72	10 min
			6	16	pausa

<sup>12</sup> Todas las mezclas de PCR fueron realizadas con agua Milli-Q estéril.

<sup>13</sup> Unidades utilizadas para el volumen total de reacción.

El volumen total de reacción usado fue de 50 µl, el amplicón obtenido fue separado y visualizado en un gel de agarosa al 1,5 %, posteriormente la mezclas fue enviada a secuenciar.

### 3.5.3.1.1 Análisis de las mutaciones QRDR.

El análisis de las mutaciones para las regiones QRDR<sup>14</sup> de los genes *gyrA* y *parC*, se realizó por análisis de los fragmentos obtenidos mediante el programa VECTOR NT11 (Life Technologies) y posterior traducción de la secuencias obtenidas a proteína, utilizando el programa Expasy (Bioinformatics Resource Portal- translate tool) <http://web.expasy.org/translate/>.

La comparación se realizó por alineamiento con secuencias de referencia de las cepas *E. coli* K-12substr (NC\_000913.2,) y *K. pneumoniae* ATCC13883 (DQ673325.1 AF303641.1), para el caso de otras especies se comparó con secuencias previamente analizadas. Para los alineamientos se utilizó el programa Uniprot Align <http://www.uniprot.org/>.

### 3.5.3.2 Detección de genes PMQR

Los genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qnrVC*, *oqxA*, *oqxB* y *qepA* fueron detectados por PCR, con *primers* específicos (55, 79, 91-94) y validados por secuenciación.

Las condiciones de amplificación de cada uno de los genes fueron las siguientes:

#### 3.5.3.2.1 *qnrA* y *qnrS*

La concentración de los reactivos utilizados en una la mezclas de reacción de 25 µl de volumen total fue la siguiente: ADN 1,5 µl, *buffer* de reacción KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, *primers* 0,4 µM, dntp (INBIO) 0,6 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 4 U. Los *primers* utilizados (Tabla 3) amplificaban secuencias internas del gen.

**Tabla 3: *Primers* y condiciones de amplificación utilizados para la detección de *qnrA* y *qnrS***

Gen	<i>Primers</i> (5'-3')	Tamaño esperado (pb).	Condiciones de ciclado		
			Pasos	Temperatura	Tiempo
<i>qnrA</i>	F	580	1	95	10 min
	R		2	95	1 min
<i>qnrS</i>	F	428	3	54	1 min
	R		4	72	1 min
			5	72	10 min
			6	16	pausa

(Pasos de 2-4) 35 ciclos

#### 3.5.3.2.2 *qnrB*

Para el gen *qnrB* se contaron con tres tipos de *primers* (Tabla 4), *qnrB*: que amplificaba fragmentos internos del gen y se utilizaban para tamizaje,

<sup>14</sup> El análisis mutacional se realizó al grupo de aislamientos de Perú y a las cepas que presentaron bombas de eflujo del tipo *qepA* y *oqxAB*

BLF: que amplificaba la totalidad del gen del *qnrB* de alelos más largos y BCF: que amplificaba la totalidad del gen de los alelos más cortos; Los dos últimos compartían el primer reverso y el amplicón de mayor tamaño obtenido fue secuenciado en todos los casos.

La concentración de los reactivos utilizados en una la mezclas de reacción de *qnrB* internos en un volumen total de 25 µl fue la siguiente: ADN 1 µl, *buffer* de reacción KCl 1X, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *primers* 0,8 µM, dntp (INBIO) 0,4 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 4U, para BIF y BC se mantuvo la misma mezcla en un volumen de 50 µl.

**Tabla 4: *Primers* y condiciones de amplificación utilizados para la detección de *qnrB***

Gen	<i>Primers</i> 5-3'	Tamaño esperado (pb)
<i>qnrB</i>		
F	GGMATHGAAAATCGCCACTG	264
R	TTTGCTGYGYYCGCCAGTCGAA	
BLF		
F	ATGWYGYCATTACTGTATA	676
R	CCMATHAYMGCGATRCCAAG	
BCF		
F	GTTRGCGAAAAAATTRACAG	626
R	CCMATHAYMGCGATRCCAAG	

Condiciones de ciclado			
Pasos	Temperatura	Tiempo	
1	95	5 min	
2	94	45seg	(Pasos de 2-4) 30 ciclos
3	55 <sup>a</sup> /54 <sup>b</sup> /51 <sup>c</sup>	45seg	
4	72	45seg	
5	72	10 min	
6	16	pausa	

Ta: temperatura de hibridación

a: Ta: de *primers* internos de *qnrB*, b: Ta de *primers* BLF y c: Ta de *primers* BCF.

### 3.5.3.2.3 *qnrC* y *qnrD*

Los reactivos utilizados para la mezclas de PCR de *qnrC* y *qnrD*, fueron los siguientes: volumen total de reacción 25 µl, ADN 1 µl, *buffer* de reacción KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *primers* 0,8 µM, dntp (INBIO) 0,4 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 4U. Las condiciones de ciclado y los *primers* se encuentran en la Tabla 5

**Tabla 5: *Primers* y condiciones de amplificación utilizados para la detección de *qnrC* y *qnrD***

Gen	<i>Primers</i> 5'-3'	Tamaño esperado (pb)
<i>qnrC</i>		
F	GGGTTGTACATTTATTGAATCG	330
R	CACCTACCCATTTATTTTCA	
<i>qnrD</i>		
F	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	582
R	AACAAGCTGAAGCGCCTG	

Condiciones de ciclado			
Pasos	Temperatura	Tiempo	
1	95	5 min	
2	95	45seg	(Pasos de 2-4) 30 ciclos
3	50 <sup>a</sup> -55 <sup>b</sup>	45seg	
4	72	45seg	
5	72	5 min	
6	16	pausa	

<sup>a</sup>: Ta de *qnrC*, <sup>b</sup>: Ta de *qnrD*.

### 3.5.3.2.4 *qnrVC*

Para detectar los diferentes alelos de *qnrVC*, se diseñaron dos pares de *primers* denominados *qnrVC1* y *qnrVC2*.

Se utilizó una mezcla con las siguientes concentraciones de reactivos para un volumen total de reacción 25  $\mu$ l, ADN 1  $\mu$ l, *buffer* de reacción KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, *primers* 0,8  $\mu$ M, dntp (INBIO) 0,4 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 5U. Los *primers* y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6: *Primers* y condiciones de amplificación utilizados para la detección de *qnrVC***

Gen	<i>Primers</i> 5'-3'	Tamaño esperado (pb).	Condiciones de ciclado			
			Pasos	Temperatura	Tiempo	
<i>qnrVC1</i>	F	TTAGTCAGGAACAATGATTAC	1	95	5 min	(Pasos de 2-4) 35ciclos
	R	TGGAAAAATCAAAGCAATTAT	2	94	1 min	
<i>qnrVC2</i>	F	GTTATATGTACAAGCAGACT	3	45 <sup>c</sup>	1 min	
	R	TCCGAGGGTCTAAACCATACA	4	72	1 min	
			5	72	10 min	
			6	16	Pausa	

### 3.5.3.2.5 *aac(6')-Ib-cr*

La variante de la enzima modificadora de aminoglicósidos, fue detectada por PCR y posterior digestión (*RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism*).

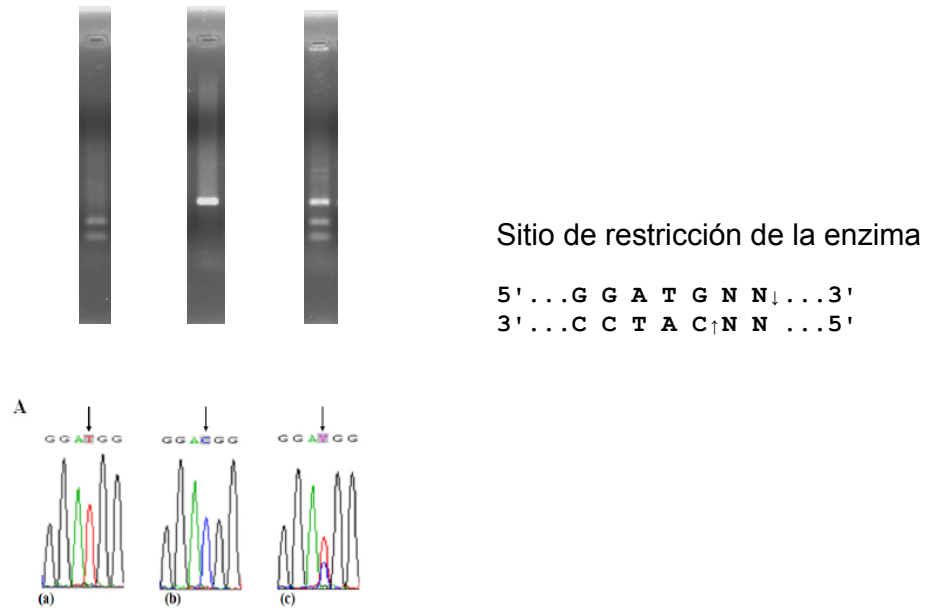
La mezcla de amplificación del gen se llevo a cabo con las siguientes concentraciones de reactivos, volumen total de reacción 25  $\mu$ l, ADN 1  $\mu$ l, *buffer* de reacción KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *primers* 0,8  $\mu$ M, dntp (INBIO) 0,4mM y Taq polimerasa (Fermentas) 5U.

**Tabla 7: *Primers* y condiciones de amplificación utilizados para la detección del gen *aac(6')-Ib***

Gen	<i>Primers</i> 5'-3'	Tamaño esperado (pb)	Condiciones de ciclador			
			Pasos	Temperatura	Tiempo	
<i>aac(6')-Ib</i>	F	CGATCTCATATCGTCGAGTGTT	1	95	10 min	(Pasos de 2-4) 35 ciclos
	R	TTAGGCATCACTGCCTGTTTC	2	94	45seg	
			3	60	45seg	
			4	72	45seg	
			5	72	10 min	
			6	16	pausa	

Los *primers* y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 7, las condiciones de digestión fueron las siguientes par un volumen total de 15  $\mu$ l : Buffer Tango amarillo10X, 1,5  $\mu$ l, agua MQ, 9  $\mu$ l, *BseG*/ 10U/  $\mu$ l 0,5  $\mu$ l (Fermentas), incubar durante tres horas y correr en un gel al 1.5 %. Los posibles patrones que pueden ser obtenidos se observan en la Figura 11.

**Figura 11: Sitio de corte y patrones de digestión de la enzima *BSEGI***



Patrones de restricción obtenidos con *BseGI*. (a) gen *aac(6')-Ib* digerido con la enzima, el electroferograma<sup>15</sup> muestra el sitio de corte de la enzima de restricción. (b) gen *aac(6')-Ib-cr* presenta cambios de nucleótido el sitio de corte de la enzima (T304C/A y G535C), evitando el reconocimiento por parte de la enzima. (c) patrón obtenido en un aislamiento con duplicaciones genicas que presenta *aac(6')-Ib* como la variante modificadora de fluorquinolonas con su respectivo electroferograma (95).

Los fragmentos no digeridos por la enzima, se enviaron a secuenciar para así confirmar la presencia e identidad del gen.

### 3.5.3.2.6 *oqxAB*

Para detectar los genes de la bomba de eflujo *OqxAB*, se determinaron los genes *oqxA* y *oqxB* por separado. Los *primers* y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 8, la posición de los primers se observa en la Figura 12.

La mezcla utilizada para las dos reacciones fue la siguiente: volumen total de reacción 25 µl, ADN 1 µl, *buffer* de reacción KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *primers* 1 µM, dntp (INBIO) 0,4 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 5 U.

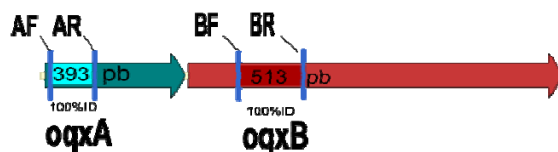
**Tabla 8: *Primers* y condiciones de amplificación utilizados para la detección de los genes *oqxA* y *oqxB***

Gen	<i>Primers</i> 5'-3'	Tamaño esperado (pb).
<i>oqxA</i>		
AF	CTCGGCGCGATGATGCT	393
AR	CCACTCTTCACGGGAGACGA	
<i>oqxB</i>		
BF	TTCTCCCCGCGGGAAGTAC	513
BR	CTCGGCCATTTGGCGCGTA	

Condiciones de cizado			
Pasos	Temperatura	Tiempo	
1	95	5 min	
2	95	45 seg	(Pasos de 2-4) 30ciclos
3	58 <sup>a</sup> /65 <sup>b</sup>	45 seg	
4	72	45 seg	
5	72	10 min	
6	16	Pausa	

<sup>a</sup> Ta para *oqxA*, <sup>b</sup> Ta para *oqxB*

**Figura 12 : Fragmentos amplificados con los *primers* utilizados en la detección de los genes de *OqxAB***



EU370913  
*E. coli* pOLA52

La figura muestra los sitios de unión de los *primers* utilizados para la amplificación de los genes *oqxA* y *oqxB*. El tamaño esperado de cada uno de los genes, se encuentra entre barras dentro del gen, AF: *primer forward oqxA*, AR: *primer revers oqxB*, BF: *primer forward oqxB*, BR: *primer revers oqxB*. El gráfico se realizó sobre la estructura depositada en GenebankK del plasmido pOLA52.

### 3.5.3.2.7 *qepA*

Teniendo en cuenta el alto porcentaje de guanina- citosina que contiene el gen que la codifica, esta bomba de eflujo fue determinada mediante PCR *Hot Star*. La mezcla utilizada en la reacción fue la siguiente: volumen total de reacción 25  $\mu$ l, ADN 1  $\mu$ l, *buffer* de reacción  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1x,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, *primers* 1 $\mu$ M, dntp (INBIO) 0,4mM y Taq polimerasa (Fermentas) 5 U, esta última se agrega a cada tubo de reacción. Las condiciones de amplificación se encuentran en la Tabla 9.

**Tabla 9: *Primers* y condiciones de amplificación utilizados para la detección del gen *qepA***

Gen	<i>Primers</i> 5'-3'	Tamaño esperado (pb)	Condiciones de ciclado		
			Pasos	Temperatura	Tiempo
<i>qepA</i>	F ACATCTACGGCTTCTTCGTCG R AACTGCTTGAGCCCGTAGATC	501	1	97 <sup>a</sup>	10 min
			2	96	1 min 15 seg
			3	63	45seg
			4	72	45seg
5	72	10 min	(Pasos de 2-4) 35 ciclos		
6	16	pausa			

<sup>a</sup> colocar 0,25  $\mu$ l de Taq en cada uno de los tubo de reacción antes de llegar a los 10 min.

### 3.5.3.3 Geles de Agarosa

Los amplicones de cada PCR se resolvieron a 6V/cm en agarosa al 1,5 % en Buffer TAE con Bromuro de etidio (BrET) 0,5  $\mu$ g/ml.



Como marcadores de tamaño; se utilizó ladder 100pb. (PB-L, Arg.), 1Kb (DNA ladder-Fermentas) o marcadores diseñados *ad hoc*. La visualización se realizó bajo luz ultravioleta y la captura de las imágenes con el sistema de documentación de imágenes Gel Doc (Bio Rad).

#### 3.5.3.4 Purificación de amplicones

Los productos de PCR fueron purificados utilizando los equipos comerciales “Accuprep PCR Purification Kit” y “Accuprep Gel Purification Kit” (BIONER, Argentina), siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### 3.5.3.5 Secuenciación

Todas las secuenciaciones de los amplicones previamente purificados, se realizaron sobre ambas cadenas de ADN, con el equipo Applied Biosystem 3730XL, llevado a cabo como servicio externo en Macrogen, Corea.

#### 3.5.3.6 Análisis de secuencias

Las secuencias resultantes se analizaron empleando un software disponible *on line* o comercial como:

Chromas Lite 2.1: que permite revisar las secuencias.

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*): que permite comparar y alinear las secuencias obtenidas con las que se encuentran en la base de datos de nucleótidos (*nucleotide blast*), como también traducir la secuencia de nucleótidos a proteína y alinear con proteínas de las bases de datos, (*blastx*).

ISFinder: [www-is.biotoul.fr](http://www-is.biotoul.fr), Base de datos de secuencias de inserción que permite comparar y alinear las secuencias obtenidas, con las que se encuentran en estas bases de datos.

Vector NTI advance 11 (Invitrogen), el cual permite realizar el ensamble (*ContigExpress*) de las dos cadenas secuenciadas y el posterior alineamiento (*Align*) con las secuencias de cada uno de los PMQR depositados en el Genbank, los que se encuentran listados en la base de datos de datos creado por la página web Lahey (<http://www.lahey.org/qnrStudies>), etc.

El análisis de los fragmentos de digestión teórica de productos de interés fue llevado a cabo en el programa Vector NTI advance 11 (Invitrogen).

#### 3.5.3.7 Clonado de productos de PCR.

Para la secuenciación de algunos productos de PCR, (amplificado de *qnrB*, BIF) se clono en pJET 1,2 utilizando el Kit de clonado CloneJET PCR Cloning KIT (Thermo Scientific, USA). El protocolo utilizado se encuentra en el Anexo I, (Figura 51).

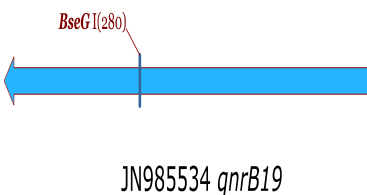
La transformación posterior a la clonación se llevo a cabo en *E. coli* Top10, donde se confirmó la presencia del gen por PCR con los *primers* BIF y *qnrB* internos. Se selecciono la célula transformante con ampicilina 30 µg/ml y el ADN se extrajo como ya fue descrito.

### 3.5.3.7.1 Digestión enzimática para detección de *qnrB19*

La digestión enzimática para la detección del gen *qnrB19*<sup>16</sup> se realizó con *BseGI* (Thermo Scientific, USA) del fragmento obtenido mediante la amplificación por PCR, utilizando los *primers* BIF.

El gen *qnrB19* tiene un sitio de restricción para esta enzima generando dos fragmentos de tamaños aproximado de 280 y 420 pb. Las condiciones de digestión fueron las siguientes: volumen total 15  $\mu$ l, Buffer Tango 10 X 1  $\mu$ l, amplicon 5  $\mu$ l, agua MQ 8,6  $\mu$ l *BseGI* 10 U/  $\mu$ l 0,4  $\mu$ l, la mezcla de reacción se incubó tres horas a 55°C, y se sembró en un gel de agarosa al 1,5%. Los sitios de corte de la enzima se encuentran en la Figura 13.

**Figura 13: Sitio de corte y condiciones de digestión del *qnrB19* con la enzima de restricción *BseGI***



En el gráfico se muestra el sitio de corte de la enzima, el cual se realizó sobre la estructura depositada en Genbank del gen *qnrB19*, que se encuentra registrado en la base de datos <http://www.lahey.org/qnrStudies>.

### 3.6 Determinación de otros genes.

Otros genes relacionados con la resistencia a quinolonas, a  $\beta$ -lactámicos, a la movilización de los mismos, u otros mecanismos de resistencia (complementaria o acompañantes) o para secuenciar genes ya detectados en trabajos de investigación anteriores fue realizada por PCR.

Los *primers* utilizados y las condiciones de amplificación se encuentran en el anexo III.

### 3.7 Transferencia de genes

Se realizaron experimentos de conjugación y de electroporación (76, 77), para transferir los genes de las bombas de *eflujo* (*qepA* y *oqxAB*). En el proceso de conjugación, se utilizó como cepas receptoras *E.coli*-J53 y en el de electroporación *E. coli* Top10F- o *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Los procedimientos realizados fueron los siguientes:

#### 3.7.1 Conjugación

1. A partir de cultivos puros de las cepas dadoras, como de la receptora, inocular por separado en tubos de 5 ml de medio de cultivo Luria Bertani (LB) y se incubó a 37°C hasta la mañana siguiente. (O/N).

<sup>16</sup> Este proceso se llevó a cabo solo en el aislamiento de *Serratia* Sp

2. Se tomaron 50  $\mu$ l de cada una de las cepas y se sembraron en 9 ml de LB, se dejaron en el *Shaker* a 180 rpm, hasta alcanzar la turbidez de 0,5 Mac Farland.
3. Se colocaron dos trozos de membrana de acetato de celulosa estéril (aproximadamente de 2 X 2 cm, con un tamaño de poro de 0,2-0,45  $\mu$ m) sobre placas de agar de tripteína soja.
4. En cada una de las membranas se agregaron superpuestos, 50  $\mu$ l de las células dadoras y 50  $\mu$ l de las células receptoras.
5. Se incubo a 37°C, y se retiró la primera membrana, con pinzas estériles, a las 4 h de incubando hasta completar 24 horas.
6. Las membranas se colocaron en sendos tubos de ensayo conicos estériles de 15 ml, se agrego asépticamente 9 ml de caldo LB y se resuspendieron las células en el medio de cultivo.
7. Se centrifugó 5 minutos a 5000 rpm en centrifuga Rolco y se descartaron los sobrenadantes y las membranas.
8. Los pellets se resuspendieron en 100  $\mu$ l de caldo LB.
9. Se sembraron los 100  $\mu$ l en los medios de selección<sup>17</sup>, utilizando (espatulas de Drigalsky) estériles, a las 24 h se retiro la segunda membrana de la placa de petri y se realizaron los pasos del 6 al 9.
10. En todas las oportunidades se plaquearon los controles en medios correspondientes para las cepas dadoras y receptoras.
11. Las placas se incubaron por 24h. a 37 grados seleccionando las colonias desarrolladas de a una y se amplificaron en medios de selección para realizar las PCRs confirmatorias de cada gen de interes.
13. En caso de no presentar crecimiento a las 24 h, se dejo incubando hasta las 48 h, para eventualmente realizar la selección de colonias igual que en el paso anterior.

### 3.7.2 Electroporación

El protocolo de desalado de plásmidos, lavado de cubetas y preparación de células competentes se encuentra en el anexo I.

El proceso de preparación para la electroporación se llevo a cabo en cabina de seguridad biológica.

1. Los tubos eppendorf con las células electrocompetentes que se encontraban a – 70°C, al igual que los plásmidos desalados a electroporar se descongelaron y mantuvieron en baño de hielo.
2. Se Lavaron las celdas a utilizar en el proceso con agua milli-Q estéril (fria) y se mantuvieron en hielo, se escurrieron bien para que no quedaran con agua.

---

<sup>17</sup> TSA más antibióticos (AMP, CIP+ AZIDA, NAL+ AZIDA.) para la selección de las transconjugantes.

3. Se vertieron de 2 a 5  $\mu$ l de las preparaciones de cada plásmido de interés sobre células electrocompetentes y se transfirió la mezcla al fondo de la cubeta de electroporación.
4. Se aplicó el pulso eléctrico, 1800 volt, 50  $\mu$ f, 100  $\Omega$ . (Electroporador BTX ECM630)
5. Se resuspendió con 500  $\mu$ l de caldo 2XYT o SOC, que fueron pasados a un tubo estéril, se lavo nuevamente la cubeta con otros 500  $\mu$ l del mismo caldo y se paso nuevamente al tubo estéril.
6. Se Incubo en agitación a 37°C durante 1 - 1,5 h, se sembro 100  $\mu$ l del cultivo con espátula de vidrio en los medios de selección para las electroporantes.
7. Se centrifugo a 5000 rpm durante 7 minutos (Micro centaur, SANYO). Se resuspendió el pellet en el sobrenadante remanente y se sembro nuevamente 100  $\mu$ l del cultivo, con la espatula de Drigalsky en los medios de selección.

Se sembrar las células competentes en medio sin antibiótico y en los medios de selección como control de calidad del proceso. Se Incubo de 24 a 48 h, seleccionando las colonias desarrolladas de a una y se amplificaron en medios de selección para realizar las PCRs confirmatorias de cada gen de interes.

### 3.8 Análisis de plásmidos

La caracterización de los plásmidos se realizó en aquellos aislamientos que presentaron las bombas de eflujo *qepA* y *oqxAB*. Para ello se determinó el tamaño y número de plásmidos en los aislamientos salvajes (o silvestres) y en las transconjugantes o electroporantes obtenidas. Además, se determinó los grupos de incompatibilidad y se tipifico los replicones de los plásmidos.

#### 3.8.1 Determinación del número y tamaño de plásmidos por electroforesis de campo pulsado con S1-nucleasa.

##### 3.8.1.1 Preparación de los *plugs*<sup>18</sup> de agarosa.

(Miranda et al (78))

1- A partir de un cultivo en placa de TSA de 18 a 24 h, se inoculo una colonia en 5 ml de caldo Infusión cerebro corazón (BHI) e incubo O/N en forma estática a 37°C.

2-Se centrifugo 1 ml de cultivo en tubos eppendorf de 1.5 ml a 12.000 rpm en microcentrifuga (Micro Centaur, SANYO) por 2 minutos.

---

<sup>18</sup> Los *plugs* contienen las células bacterianas embebidas en agarosa, de forma que permite realizar la lisis bacteriana “in situ”, para evitar la ruptura de ADN, son utilizados tanto para conocer el tamaño de los plásmidos de alto peso molecular, como para determinar clonalidad por PFGE de la misma especie (Descrito más adelante).

3- Se elimino el sobrenadante con pipeta automática y se resuspendio el *pellet* bacteriano con 1 ml de PIV<sup>19</sup>. Se recentrifugo y elimino todo el sobrenadante.

4- Se resuspendio el *pellet* bacteriano con 200 µl de PIV (consideramos al volumen inicial como 210µl)

5- Se coloco 5 µl de la suspensión bacteriana en una cubeta descartable conteniendo 1 ml de PIV (dilución 1:200).Se cubrio la cubeta con parafilm y se homogeneizo por inversión.

6- Se midio la DO<sub>620</sub> nm, empleando PIV como blanco. La DO<sub>620</sub> estuvo siempre entre 0,05 – 0,15. Se calculo elvolumen de PIV necesario a agregar a la suspensión bacteriana (Tabla 10), para alcanzar una DO<sub>620</sub> de 5 unidades, según la siguiente fórmula:

$$\text{Vol. PIV a agregar en } (\mu\text{l}) = (\text{DO}_{\text{medida}} \times 40 \times 210) - 210$$

**Tabla 10: Dilución con PIV según DO**

DO <sub>medida</sub>	Volumen PIV a agregar (µl)	Volumen Final (µl)
<0,05	Concentrar	-
0,05	210	420
0,07	378	588
0,09	546	756
0,11	714	924
0,13	882	1092
0,15	1050	1260
>0,15	Hacer dilución en otro tubo.	-

8. Se limpiaron los vidrios para preparación de los *plugs* con alcohol 70 %, y se transfirió 150 µl de la suspensión bacteriana (DO<sub>620</sub>= 5 unidades) a un eppendorf de 1,5 ml, para ser incubado durante 10 minutos a 50°C.

9. Se agrego a la suspensión bacteriana, 150 µl de agarosa al 1,6 %, precalentada a 50 °C y se mezclo rápidamente con vortex. Se pipeteó la mezcla en los moldes y se dejo solidificar a T° ambiente.

11. los moldes se llevaron a refrigerar a 4 °C, durante 45 minutos.y posteriormente se se removio cuidadosamente los *plugs* con un ansa descartable y se colocaron en tubos de 15 ml con 1 ml de *buffer* de Lisis. Incubar O/N a 37 °C.

12. Se remplazo el *buffer* de lisis por *buffer* ES-P e Incubo los *plugs* durante 24 h más a 50 °C.

<sup>19</sup> Buffer utilizado en PFGE, sus componenetes se encuentran en el Anexo III.

13. Se lavaron los *plugs* con *buffer* TE 1X para eliminar la proteinasa K y se repitió este procedimiento al menos 5 veces, dejando actuar cada lavado al menos 30 minutos. Los *plugs* se conservaron a 4°C hasta el momento de uso (1 día después) y guardados durante máximo 3 a 4 meses.

### 3.8.1.2 Digestión con S1<sup>20</sup> nucleasa

(Barton *et al* (59). Mod.) :

1. Los *plugs* se equilibraron con 200 µl del *buffer* 1X para S1- nucleasa. Incubado a T° ambiente durante 30 min a esta mezcla se añadió 0,2 µl (10 U/µl) de S1- nucleasa y se incubó durante 1 hs a 37°C.

2- Se colocan los *plugs* dentro del gel de corrida (agarosa para PFGE al 1,3%-1,5% en *buffer* TBE 0,5X) y se corre el gel en pulsos de 5 a 60 segundos durante 20 horas a 200 Volts.

El tamaño aproximado de los plásmidos se obtuvo tomando como punto de referencia el marcador de peso lambda ladder (New England).

### 3.8.2 Clasificación de plásmidos de acuerdo a la tipificación de replicones (PBRT)

Los plásmidos se clasificaron según los grupos de incompatibilidad según la técnica desarrollada por Carattoli *et al* (56).

Resumidamente consiste en 5 PCR multiplex y 3 PCR simples las cuales permiten reconocer los grupos FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iγ, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, y FIIA.

Los pares de *primers* utilizados y los grupos detectados se pueden observar en la Tabla 11.

El ADN total obtenido por ebullición tanto de los aislamientos originales como de las transformantes.

Las condiciones de la mezcla de reacción (volumen total de 25 µl) incluyen ADN 1 µl, *buffer* de reacción KCL 1x, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *primers* mix 1 µM<sup>21</sup>, dntp (INBIO) 0,4 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 4U.

Los *primers* utilizados y las condiciones de amplificación se encuentran en las Tabla 11 y Tabla 12

<sup>20</sup> La digestión con S1- nucleasa permite linearizar los plásmidos, para así determinar su tamaño.

<sup>21</sup> La Mix de primers se hizo para cada múltiplex, con los *primers* de las tres reacciones ( un total de 6 *primers*) de tal forma que todos quedaron en concentración de 10 mM y se completó con H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril.

**Tabla 11: Multiplex para la tipificación por PCR basada en los grupos (inc/rep) para plásmidos de *Enterobacteriaceae***

	Primer	Secuencia 5'...3'	Sitio blanco de amplificación	Tamaño (pb.)	Grupo Inc/rep
Multiplex 1	H11 Fw H11 RV	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	parA-parB	471	H11
	H12 Fw H12 RV	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC GGTCACTACCGTTGTCATCCT	iterons	644	H12
	I1 Fw I1 RV	CGAAAGCCGGACGGCAGAA TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	RNAI	139	I1
Multiplex 2	X Fw X RV	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	ori $\gamma$	376	X
	L/M Fw L/M RV	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG CTGCAGGGGCCATTCTTTAGG	repA, B, C	785	L/M
	N Fw N RV	GTCTAACGAGCTTACCGAAG GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	repA	559	N
Multiplex 3	FIA Fw FIA RV	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	iterons	462	FIA
	FIB Fw FIB RV	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	repA	702	FIB
	W Fw W RV R	CCTAAGAACAACAAGCCCCCG GGTGCGCGGCATAGAACCCT	repA	242	W
Multiplex 4	Y Fw Y RV	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	repA	765	Y
	P Fw P RV	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	iterons	534	P
	FIC Fw FIC RV	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	repA2	262	FIC
Multiplex 5	A/C Fw A/C RV	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	repA	465	A/C
	T Fw T RV	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT CGTTGATTCACCTTAGCTTTGGAC	repA	750	T
	FII <sub>s</sub> Fw FII <sub>s</sub> RV	CTGTGCTAAGCTGATGGC CTCTGCCACAAACTTCAGC	repA	270	FIIA
Sim.	F <sub>repB</sub> Fw F <sub>repB</sub> RV	TGATCGTTTTAAGGAATTTTG GAAGATCAGTCACACCATCC	RNAI/repA	270	F
Sim.	K/B Fw K RV	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	RNAI	160	K
Sim.	K/B Fw B/O RV	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	RNAI	159	B/O

Sim: PCR simple

**Tabla 12: condiciones de amplificación utilizados para la para la tipificación por *PBRT*.**

Condiciones de ciclado			
Pasos	Temperatura	Tiempo	
1	94	5 min	
2	94	1 min	(Pasos de 2-4) 30 ciclos
3	60 <sup>a</sup> /52 <sup>b</sup>	30 seg <sup>a</sup> / 1min <sup>b</sup>	
4	72	1 min	
5	72	5 min	
6	16	pausa	

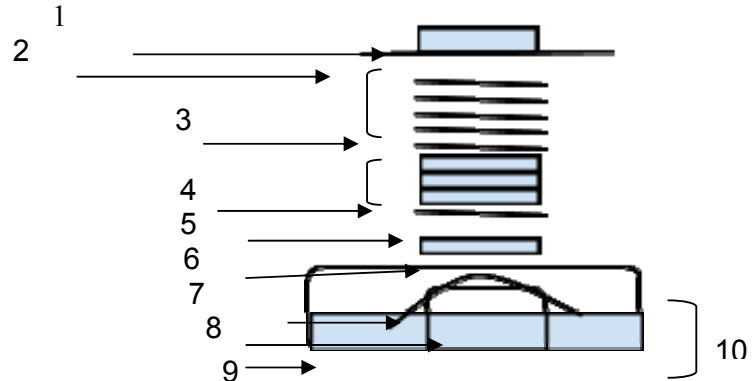
La tabla presenta las condiciones de ciclado utilizadas para <sup>a</sup> la Multiplex PCR y <sup>b</sup> para las PCR simples donde los cambios se produce en la temperatura y el tiempo de hibridación.

### 3.8.3 Southern Blot

#### 3.8.3.1 Transferencia de geles

1. Se corto las áreas del gel no deseadas, incluyendo la sección de arriba de las calles y una de las puntas en diagonal para mantener la orientación del gel
2. Se sumergio el gel en varios volúmenes de HCl 0,2 N y se agitó suavemente durante 10 min, se lavo con agua destilada.
3. Se desnaturalizó sumergiendo el gel en varios volúmenes de buffer de desnaturalización (0,4 N NaOH, 3 M NaCl) durante 15 a 30 min en constante agitación, a temperatura ambiente, se lavo nuevamente con agua destilada.
4. Se corto la membrana del mismo tamaño que el gel y se transfirió, igual que el gel en la membrana recorto la punta en forma diagonal (membrana Hybond N+ ( carga positiva); Amersham Pharmacia Biotech).
5. Se coloco la membrana durante 15 min en buffer de transferencia (8mM NaOH 3M NaCl) y se armo el sistema de (*blotting*) como lo muestra la Figura 14
6. Se ejerce presión en forma homogénea durante toda la noche y se retira la membrana del gel.
7. para verificar la transferencia se tiñio el gel con bromuro de etidio.
8. Se lavo la membrana en buffer fosfato durante 10 min y se dejo secar a 80°C, adicionalmente se fijo con UV durante 10 seg.
9. La membrana reguardo seca hasta su uso.



**Figura 14 Esquema utilizado para la transferencia de geles**

1. Peso, 2. Vidrio, 3. 40 a 80 papeles secante\*, 4. Tres papeles filtro\*, 5. Membrana de transferencia\*, 6. Gel con el frente hacia abajo\*, 7. Papel secante, 8. Soporte de gel, 9. *Buffer* de transferencia, y 10. Recipiente para el buffer. (\* Todos cortados al mismo tamaño).

### 3.8.3.2 Hibridación

En el proceso de hibridación se utilizó el protocolo sugerido por el fabricante del kit *Dig Easy Hyb* (Roche); donde el marcaje se lleva a cabo con digoxigenina (DIG)

#### Marcaje de la sonda

1- se amplificó en cada caso el gen a detectar por PCR. En todos los casos el fragmento fue superior a 100 pb.

2. Los amplicones fueron purificados utilizando el kit de purificación “*Accuprep PCR Purification Kit*” nombrado anteriormente y cuantificados de manera que se obtenga una concentración 10ng-3µg, después de su dilución a 16 µl con agua milli Q estéril.

3. El ADN fue desnaturalizado en un baño de agua a ebullición por 10 min y enfriado rápidamente sobre hielo por dos min

4. Se homogenizó bien el vial 1 “*Dig-High Prime*” y agregó 4 µl al ADN desnaturalizado, y se mezcló completamente.

5. Se incubó O/N a 37 °C y se detuvo la reacción añadiendo 2 µl de 0,2 M EDTA (pH: 8).

#### Hibridación

6. Se calculó la  $T^{\circ}$  de hibridación con la siguiente fórmula:

$T_m: 49,82 + 0,41 \times (\% \text{ CG}) - (600/\text{longitud de la sonda en pb})$  y se eligió una temperatura óptima teórica menor en 20 a 25 °C del  $T_m$ .

7. Se precalentó el volumen que se usaría de *Dig Easy Hyb* (10 ml cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana) a la temperatura que quería hibridar.

8. Se prehibrida la membrana 30 min con agitación en el horno de (hibridación Hb1000 Hybridizer) y se desnaturaliza la sonda marcada (0,7  $\mu$ l de sonda en 50  $\mu$ l de agua), se calienta 5 min a ebullición y enfriar rápidamente en hielo durante 2 minutos, se coloca 25 ng de sonda por cada ml de “*DiG Easy Hyb*”.

9. Se agregar la sonda desnaturalizada a “*DiG Easy Hyb*” y se utilizar 3,5 ml por cada 100 cm<sup>2</sup> de membrana. Se mezcla completamente con la membrana de tal forma que quedara cubierta.

10. Se descarto la solución de pre-hibridación y se agrego la solución con sonda, se incubo durante 4 h a la temperatura calculada, con agitación en el horno de hibridación. La sonda se utilizó inmediatamente.

### **Lavados**

11. Se lavo 3 veces durante 5 min en solución de SSC 2X conteniendo 0,1 % SDS, a 15-25 °C en agitación a temperatura ambiente. Luego se lavo 3 veces más durante 15 min en constante agitación con solución de SSC 0,5X conteniendo 0,1 % SDS, previamente precalentado a 68 °C.

### **Detección Inmunológica**

12. Se impregno la membrana con buffer de lavado (durante 5 min) y se incubo durante 30 min en solución de bloqueo, utilizando 100 ml para membranas por ser una membrana grande.

13. Se realizó un *spin* del vial de solución de anticuerpo en microcentrífuga (Micro Centaur, SANYO).y se tomor una alícuota de la superficie del vial para diluir 1:10.000 en la solución de bloqueo.

14. Se incubo 30 min mas en 20 ml de solución de anticuerpo y se lavo 2 veces por 15 min en 100 ml. de buffer de lavado.

15. Se equilibrio 5 min en *buffer* de detección y se coloco la membrana sobre film de nylon con los *dots* hacia arriba, para aplicar 1 ml de CSPD durante 5 min.

15. Se eliminó el exceso de líquido y se cubrio con el film evitando que se formen burbujas o líneas; se incubo 10 min mas 37 °C para aumentar la reacción luminiscente.

16. La película radiografica (Kodak, base verde) fue cortada al mismo tamaño que la membrana de Nylon, y en un cuarto oscuro se colocaron una sobre otra en un caset de revelado. Posterior a 20 min, se relevo la película con líquidos de revelado fotografico.

Los reactivos usados se encuentran detallados en el anexo II.

## **3.9 Análisis de los aislamientos clínicos.**

### **3.9.1 Grupos filogenéticos**

El análisis de los grupos filogenéticos se llevó a cabo en todos los aislamientos de *E. coli* pertenecientes a los tres poblaciones analizadas.

El esquema utilizado fue el planteado por Clermont *et al* (79) donde mediante una multiplex PCR se detectan tres diferentes genes, *chuA*, *yjaA* y *tspE4R*. Posteriormente los amplicones fueron observados en un gel de agarosa al 1,5 % en buffer TAE, teñidos con ETBr, fotografiados y analizados según el patron de bandas que presentaron.

En la Tabla 13 se puede observar los *primers* y condiciones utilizadas para la amplificación.

**Tabla 13: *Primers* y condiciones de amplificación utilizados para la detección de los genes para la determinación de grupos filogenéticos en *E. coli***

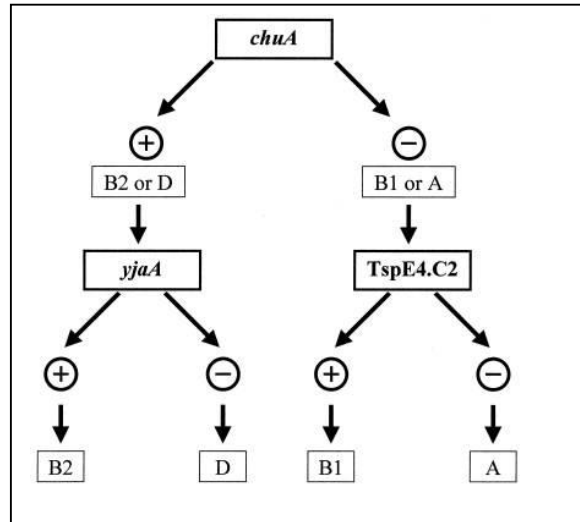
Gen	Primers 5'-3'	Tño esperado	Condiciones de ciclado			
			Pasos	Temperatura	Tiempo	
<i>chuA</i>	F GACGAAACCAACGGTCAGGAT	279	1	94	5 min	
	R TGCCGCCAGTACCAAAGACA					
<i>YJaA</i>	F TGAAGTGTTCAGGAGACGCTG	211	2	95	45 seg	(Pasos de 2-4) 30 ciclos
	R ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		3	<b>58</b>	45seg	
		4	72	45seg		
		5	72	10 min		
<i>TspE4R</i>	F GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152	6	16	pausa	
	R CGCGCCAACAAAGTATTACG					

La mezcla utilizada en la reacción fue la siguiente: volumen total de reacción 25 µl, ADN 3 µl, *buffer* de reacción KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, *primers* 0,45 µM cada uno, dntp (INBIO) 0,4 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 5U.

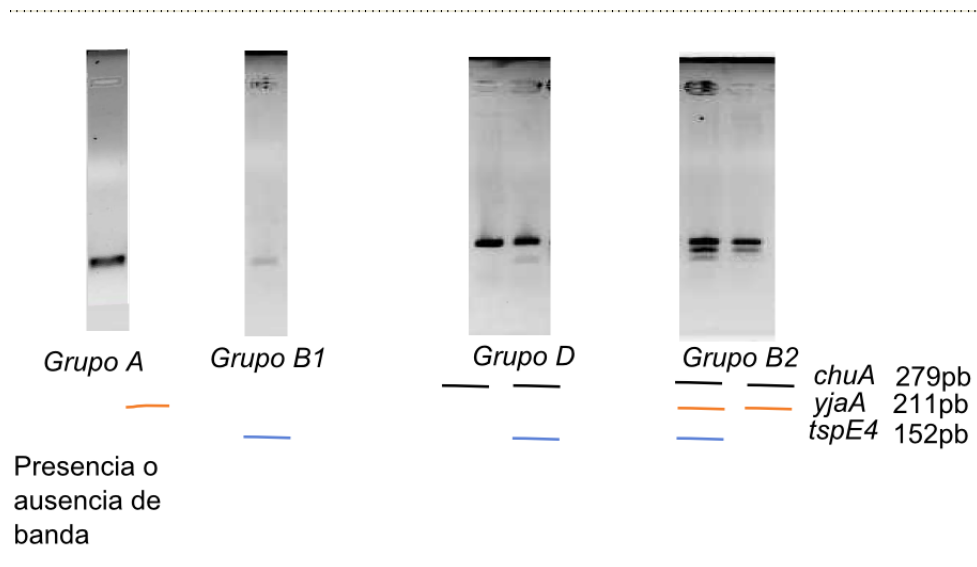
### Interpretación

La interpretación se realizó en base a la presencia, ausencia y combinación de los productos de PCR, determinando así el grupo filogenético, según árbol dicotómico de Clermont *et al*. (Figura 15, Figura 16)

**Figura 15: Árbol dicotómico para determinar el grupo filogenético en *E. coli* (Clermont *et al*)**



**Figura 16: Patrones obtenidos en cada grupo filogenético por multiplex PCR**



### 3.9.2 Clonalidad

Las técnicas de ERIC-PCR (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based PCR*) y REP-PCR (*repetitive element palindromic PCR*) se utilizaron principalmente para el análisis de clonalidad de los aislamientos de un mismo país, adicionalmente, estas técnicas se utilizaron en la diferenciación de cepas dadoras y transconjugantes cuando los dos aislamientos, tanto dadora como receptora utilizadas fueron pertenecientes a la misma especie (*E. coli*)

Otra de las técnicas utilizadas fue PFGE, donde la preparación de *plugs* y las condiciones de corrida se encuentran descritas en el apartado 3.8.1, donde se utilizó la enzima *Xba*I (Fermentas), con su correspondiente *buffer*.

### 3.9.2.1 ERIC y REP PCR.

La mezcla utilizada en las reacción tanto de ERIC- PCR, como de REP-PCR fue la siguiente: volumen total de reacción 25  $\mu$ l, ADN 5  $\mu$ l, *buffer* de reacción KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, *primers* 1,2  $\mu$ M cada uno, dntp (INBIO) 1,2 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 10 U.

Los *primers* y las condiciones utilizadas para la amplificación, se pueden observar en la Tabla 14,

**Tabla 14: *Primers* y condiciones de amplificación utilizados para ERIC y REP-PCR**

Gen	<i>Primers</i> 5'-3'	Condiciones de ciclador		
		Pasos	Temperatura	Tiempo
ERIC	Eric1 CACTTAGGGGTCCTCAATGTA	1	94	2 min
		2	94	30 seg
REP	Rep1 GCGCCGICATCAGGC	3	50	1min
		4	72	4 min
		5	72	7 min
		6	16	Pausa

La corrida de los fragmentos resultantes se realizó en agarosa al 1,5% en TBE, a un voltaje entre 65-70 voltios durante aprox. 3 horas.

### 3.9.2.2 Digestión con *Xba*I.

(miranda *et al*,(98))

1. Se equilibraron los *plugs* con 250  $\mu$ l del Buffer 1X apropiado para la enzima *Xba*I, se incubo a T° ambiente durante 30 min y se añadió 0,2  $\mu$ l (10 U/ $\mu$ l) de S1- nucleasa, se incubo durante 20 h a 37 °C.

2. Se colocaron los *plugs* dentro del gel de corrida (agarosa para PFGE al 1 % en Buffer TBE 0,5X) y se corrió el gel con pulsos de 5 a 60 s durante 20 h a 6Volts/cm. En el equipo CHEF-DR-II System (Biorad).

Interpretación: la interpretación se realizó de acuerdo a los lineamientos de Tenover *et al* (80), donde:

Donde:

- Dos aislamientos se consideran indistinguibles, si no difieren en el patrón de bandas, y por lo tanto las cepas analizadas se pueden asociar.
- El aislamiento se encuentra estrechamente relacionado con otro, si se diferencian en dos o tres bandas.

- Un aislamiento esta posiblemente relacionado, si se diferencian en cuatro a seis bandas.
- Un aislamiento es distinto si se diferencia por siete o más bandas.

### 3.9.2.3 Multilocus sequence Typing (MLST)

La determinación de los secuenciotipos (ST) de *E. coli* y *K. pneumoniae* se realizó por MLST. Adicionalmente del MLST, en *K. pneumoniae* formadoras de colonias mucosas se realizó en estas cepas la búsqueda de genes los genes de virulencia *magA* (*wzy*) y *rmpA* que corresponden a:

*magA* (WZY): genA, asociado a la hiperviscosidad correspondiente al tipo capsular K1 que se encuentra en cepas de *K. pneumoniae* relacionadas a la formación de absceso hepático, y endoftalmítis, principalmente en pacientes diabéticos (81)

*rmpA*: es un gen que codifica para un factor de virulencia codificado a nivel plasmídico que corresponde a un regulador del fenotipo mucoide A. (103, 104))

#### 3.9.2.3.1 MLST *E. coli*

El ST de *E. coli* se realizó usando el esquema desarrollado por el grupo de Achtman (Wirth *et al.* (82) )

En este esquema se analizan fragmentos internos de siete genes *housekeeping*, que son analizados utilizando la base de datos de la universidad de Warwick encontrada en el siguiente link.

<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/documents/primersColi.html>.

Los genes utilizados como blanco son *adh* Adenilato quinasa; *fum*, fumarato hidratasa; *gyrB*: ADN girasa; *icd*: isocitrato /isopropilmalato dehidrogenasa; *mdh*: malato deshidrogenasa, *purA*: adenilosuccinato deshidrogenasa; *recA*: motivo de unión ATP/GTP).

#### 3.9.2.3.2 MLST de *K. pneumoniae*.

El ST de *K. pneumoniae* se llevo a cabo usando el esquema desarrollado en el instituto Pasteur por Diancourt *et al* (83) y Brisse *et al* (84).

En este esquema se analizan fragmentos internos de siete genes *housekeeping*, que son analizados utilizando la base de datos del instituto Pasteur encontrado en el siguiente link:

[http://bigsdw.web.pasteur.fr/perl/bigsdw/bigsdw.pl?db=pubmlst\\_klebsiella\\_sqdef\\_public](http://bigsdw.web.pasteur.fr/perl/bigsdw/bigsdw.pl?db=pubmlst_klebsiella_sqdef_public)

Los genes “*housekeeping*” amplificados corresponden a: *rpoB*: Sub unidad Beta de la ARN polimerasa, *gapA*: Glicer aldehído-3- fosfato dehidrogenasa, *mdh*: Malato dehidrogenasa, *pgi*: Fosfoglucoasa isomerasa, *phoE*: Fosforina E *infB*: Factor 2 de la iniciación de la translación y *tonB*: Transductor de energía periplásmica. según la base de datos del instituto Pasteur (83).

### 3.9.3 Detección de genes de virulencia *magA* y *rpmA* en *K. pneumoniae*.

La mezcla de reacción utilizada para los dos genes, anteriormente descritos fue la siguiente: volumen total de reacción 25  $\mu$ l, ADN 2,5  $\mu$ l, *buffer* de reacción KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, *primers* 1 $\mu$ M cada uno, dntp (INBIO) 0,4 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 4U; los *primers* y condiciones de amplificación se encuentran en la Tabla 15.

**Tabla 15: *Primers* y condiciones de amplificación utilizados para la detección de los genes *magA* y *rpmA***

Gen	<i>Primers</i> 5'-3'	Tamaño esperado Pb.	Ondiciones de Ciclada			
			Pasos	Temperatura	Tiempo	
<i>magA</i>	F	CGCCGCAAATACGAGAAGTG	540			
	R	GCAATCGAAGTGAAGAGTGC				
<i>rpmA</i>	F	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	516			
	R	CTTGCATGAGCCATCTTTCA				

Ondiciones de Ciclada			
Pasos	Temperatura	Tiempo	
1	95	5 min	
2	95	1 min	(Pasos de 2-4) 30 ciclos
3	55	1min	
4	72	1 min	
5	72	10 min	
6	16	Pausa	

### 3.9.4 Entornos genéticos de *QepA* y *OqxAB*

Para dilucidar los entornos de los genes de las bombas de efflujo *qepA* y *oqxAB*, se diseñaron *primers* para realizar el mapeo genético, como se explica a continuación

#### 3.9.4.1 Diseño de *primers* de *qepA*

Los *primers* fueron diseñados en base al mapeo del plásmido pHPA, el cual fue obtenido de un aislamiento clínico de *E. coli* C316 en Japón por Yamane *et al* (85).

Los *primers* denominados *qepA1* y *qepA2* fueron usados de tamizaje para la detección del gen, así como *rmtB* el cual se utilizó para determinar la presencia de este, El resto de los *primers* de la Tabla 16 fueron diseñados para conocer el entorno.

**Tabla 16: *Primers* utilizados en el entorno del gen *qepA***

Gen	<i>Primers</i> 5'-3'	Tamaños esperados	Ta.	Región
IS26F	TCACTCCACGATTTACCGCT	~1000	63	up stream
<i>qepA1</i> F	ACATCTACGGCTTCTTCGTCG	501	63	<i>qepA</i>
<i>qepA1</i> R	AACTGCTTGAGCCCGTAGATC			
<i>qepA2</i> F	CGTGTTGCTGGAGTTCTTC	403	63	
<i>qepA2</i> R	CTGCAGGTACTGCGTCATG			

<i>qepA3F</i>	GGAGACGGTGTCCGAATTCA	831	55	<i>tnpA</i> <i>ISCR3</i>
<i>qepA3R</i>	CTCACAGACGTCCGATCCGT			
<i>qepA4F</i>	CGCGAGGGGTTGCGTATAGGAAGT	1360	63	
<i>qepA4R</i>	GCCAGCAAGCCAGAAGCCAT			
<i>qepA5F</i>	GCCTTACCAACGCGTACAG	831	49	groEL/Int1
<i>qepA5R</i>	TTTTCTCCAACGCAACCAGC			
<i>qepA6F</i>	GCGCTGGTTGCGTTGGAGAAAA	750	55	rmtB
<i>qepA6R</i>	GCGCATGGCTGTCAGCTTTC			
<i>rmtBF</i>	ATGAACATCAACGATGCCCTC	769	59	
<i>rmtBR</i>	CCTTCTGATTGGCTTATCCA			

Las condiciones utilizadas en el termociclador para la amplificación del entorno se encuentran resumidas en la Tabla 17 excepto para la zona *upstream* donde el tiempo de extensión fue de 3 min.

La mezcla de reacción se realizó en un volumen total de 50  $\mu$ l: ADN 2  $\mu$ l, buffer de reacción (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1x, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, *primers* 1  $\mu$ M cada uno, dntp (INBIO) 0,4 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 5U.

**Tabla 17: Condiciones de amplificación utilizadas para el mapeo del gen *qepA***

Condiciones de ciclado			
Pasos	Temperatura	Tiempo	
1	97	10 min	
2	96	1'15" min	(Pasos de 2-4) 35ciclos
3	Ta	1min	
4	72	2 min	
5	72	20 min	
6	16	Pausa	

#### 3.9.4.2 Diseño de *primers* de *oqxAB*

Los *primers* se diseñaron en base al plásmido de *E. coli* donde fue detectado por primera vez la bomba de eflujo OqxAB y el cual fue denominado pOLA52 (64). Los *primers* que fueron utilizados para el mapeo de los aislamientos se encuentran en la Tabla 18

La mezcla de reacción se realizó en un volumen total de reacción 50  $\mu$ l, ADN 2  $\mu$ l, *buffer* de reacción KCl 1x, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, *primers* 1  $\mu$ M cada uno, dntp (INBIO) 0,4 mM y Taq polimerasa (Fermentas) 5U.

Las condiciones utilizadas en el termociclador se encuentran en la Tabla 19.



**Tabla 18: Primers utilizados en el mapeo por PCR de los aislamientos positivos para *OqxAB***

Gen	Primers 5'-3''	Tamaños esperados	Ta.	Región
IS26F	TCACTCCACGATTTACCGCT	~1000	58	up stream
<i>oqxA1F</i>	ATGAGCCTGCAAAAAACCTG	1418	61	<i>oqxA</i>
<i>oqxA1F</i>	CTCGGCGCGATGATGCT	393	58	
<i>oqxA1R</i>	CCACTCTTCACGGGAGACGA			
<i>oqxA2F</i>	TCGTCTCCCGTGAAGAGTGG	1003	61	
<i>oqxA2R</i>	GCCGTTGATCGCTTCCTCCA			
<i>oqxB1F</i>	TTCTCCCCCGGCGGGAAGTAC	513	63	<i>oqxB</i>
<i>oqxB1R</i>	CTCGGCCATTTTGCGCGTA			
<i>oqxB2F</i>	GCGCCACCCTTAACTGATCC	985	59	
<i>oqxB3R</i>	GTTGAGCTGCGCAGGAAAA	1167	61	
<i>oqxB4F</i>	GCTGATCGATCGCCTGTTTG	832	61	
<i>oqxB4R</i>	TTCCACGCTCTCGCGGTATG			
<i>oqxB5F</i>	TCTCGGCTCGTCTTATGTCA	803	61	
<i>oqxB5R</i>	ACAGACCGAAGAGCGTCACG			
<i>oqxB6F</i>	GCTGTTTGGCGTCTGGCTGA	757	61	RrF2
<i>oqxB6R</i>	ATTCATCTTGGCCGTCGGC			

**Tabla 19: Condiciones generales de amplificación para el mapeo de los genes de *oqxA* y *oqxB***

Condiciones de ciclado			
Pasos	Temperatura	Tiempo	
1	95	5 min	
2	95	1' min	(Pasos de 2-4) 35ciclos
3	Ta	1min	
4	72	2 min	
5	72	20 min	
6	16	Pausa	
Agarosa 1.5%			

### 3.9.4.3 Manejo de amplicones

Los fragmentos amplificados tanto para el entorno de *qepA*, como para *oqxA* y *oqxB*, fueron visualizados en geles de agarosa al 1 yal 1,5% en TAE, fotografiados, y purificados para enviarlos a secuenciar.

Posteriormente fueron analizados con el programa vector NT111 (Invitrogen) y analizados con la base de datos BLAST (<http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



# Resultados

---



## 4.0 RESULTADOS

### 4.1 Argentina

Se analizaron 57 aislamientos de *Enterobacteriaceae* resistentes a CTG, que cumplieron los criterios de inclusión y fueron considerados como muestra representativa del total 1586 aislamientos clínicos, recolectados en octubre del 2010, en hospitales de diferentes regiones de Argentina.

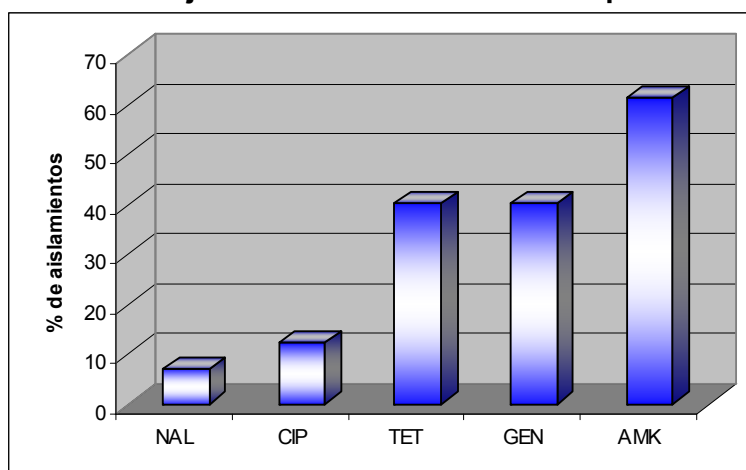
Adicionalmente, se incluyó un aislamiento (B2), que se descartó del estudio anterior (sensible a CTG), pero que presentó un alto nivel de resistencia a quinolonas. Este aislamiento se describe en forma separada al grupo anterior en el ítem 4.5.

#### 4.1.1 Sensibilidad antibiótica

##### 4.1.1.1 Antibiograma por difusión.

En los 57 aislamientos analizados, se observó una sensibilidad a NAL de 7 % (4/57), a CIP del 12 % (7/57), a GEN del 40,4 % (23/57), AMK del 61,4 % (35/57) y a TET del 40,4 % (23/57) (Figura 17).

**Figura 17: Porcentaje de sensibilidad antibiótica por antibiograma<sup>22</sup>**

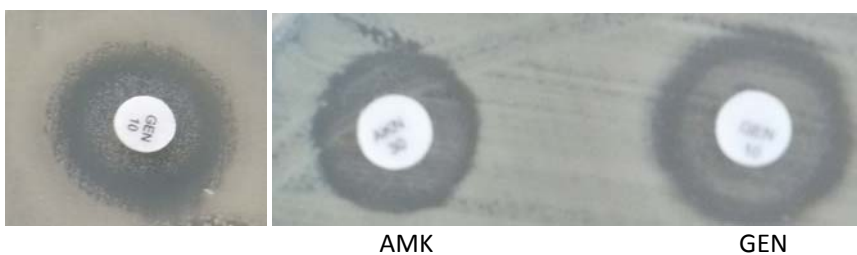


Las barras representan el porcentaje de sensibilidad de los aislamientos de Argentina a los antibióticos probados.

Como resultado llamativo, se destaca el comportamiento de tres de los aislamientos (B5, CV1 y CM1) que presentaron un patrón de doble halo con inhibición del crecimiento entre ellos, con los discos de GEN y AMK, (Figura 18). Los tres aislamientos presentaron CIM altas ( $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ ) frente a los aminoglicósidos (Tabla 22)

<sup>22</sup> Se refiere al antibiograma por difusión en medio sólido, de aca en adelante se considerara solamente como antibiograma.

**Figura 18: Patrón fenotípico no usual encontrado en los aislamientos B5, CV1 y CM1 a los discos de GEN y AMK**



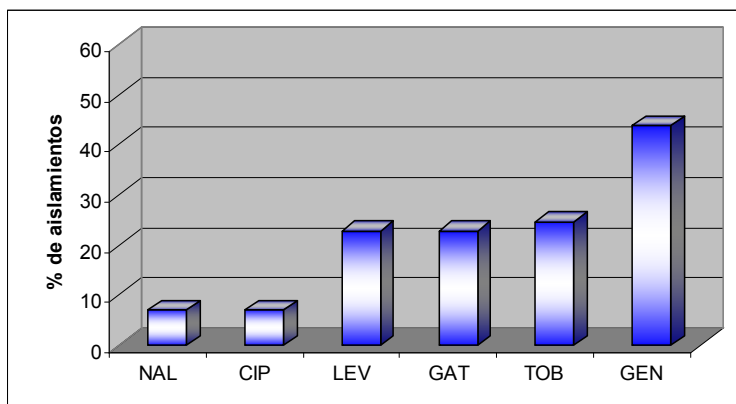
En la figura se observa el patrón de doble halo, obtenido con los discos de AMK y GEN en tres de los aislamientos de Argentina.

#### 4.1.1.2 Concentración inhibitoria mínima (CIM).

Los resultados obtenidos por CIM, son similares a los obtenidos por difusión en disco frente a NAL y CIP (7 %), se obtienen porcentajes de sensibilidad de 22,8 % (13/57) tanto frente a LVX como a GAT; frente a GEN se observa un porcentaje 43,8 % de sensibilidad (25/57), ligeramente superior al obtenido por difusión en disco, la sensibilidad a TOB fue del 25,5 %, Figura 19.

La CIM a AMK solo se realizó en los aislamientos que posteriormente fueron categorizados como PMQR positivos y los datos se presentan en la Tabla 22.

**Figura 19: Porcentaje de Sensibilidad por CIM**



Las barras representan el porcentaje de sensibilidad en la población de microorganismos resistentes a cefalosporinas de tercera generación analizados.

#### 4.1.2 Tipificación de la población

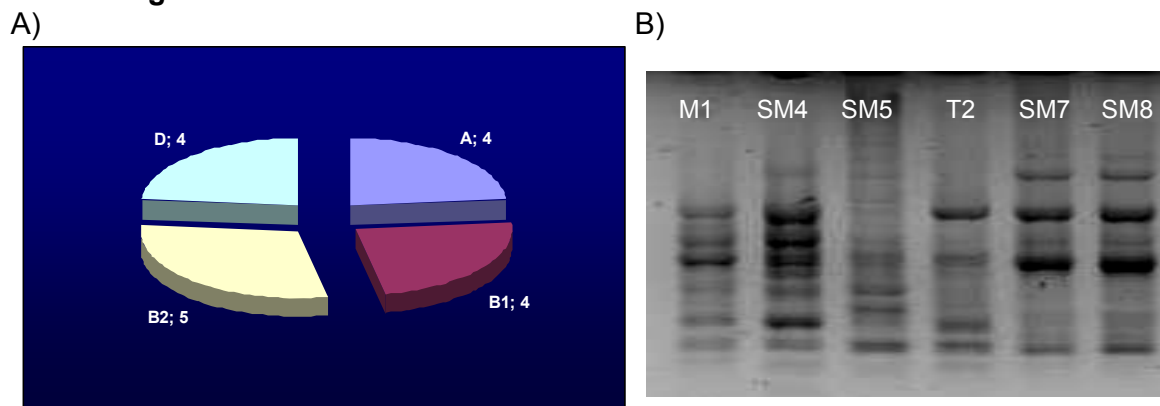
Del total de aislamientos analizados (N = 57), 17 aislamientos fueron *E. coli*. Cuyos grupos filogenéticos se muestran en la Figura 20, en la que se observa una población heterogénea, con todos los grupos presentes, sobresaliendo el grupo B2 por tener un aislamiento más.

Al analizar la distribución de los distintos mecanismos de resistencia en las 17 *E. coli* con RCTG se observó que en el grupo B2 se encontraron solo aislamientos portadores de CTX-M-15 (5/5), en el grupo D principalmente aquellos productores de CTX-M-14 (3/4) mientras que los restantes filogrupos mostraron una distribución de beta-lactamasas heterogénea (en el grupo A encontramos 2 productores de CTX-M-15, 1 de CMY-2 y 1 de SHV-2; en el grupo B1 encontramos 2 productores de CTX-M-2, 1 de CTX-M-14 y 1 de CMY-2)

En análisis por ERIC/REP-PCR mostró heterogenicidad clonal, ya que solo dos presentaron patrones de amplificación semejante tanto por REP-PCR como por ERIC-PCR (SM7 y SM8, Figura 20), sin embargo estos dos aislamientos presentan diferencias frente a los determinantes de resistencia del tipo PMQR (Tabla 22). Los secuenciotipos solo fueron realizados para aquellos aislamientos que presentan mecanismos PMQR. Los mismos se describirán mas adelante en la Tabla 22

Por otro lado, las 23 *K. pneumoniae* analizadas también mostraron heterogeneidad poblacional por ERIC-PCR y REP-PCR, aunque 4 aislamientos mostraron el mismo perfil de amplificación (denominado clon Kp1, Tabla 22), también en este caso, se presentaron diferencias en los los determinantes tipo PMQR presentados, este clon se le considero el clon prevalente.

**Figura 20: ERIC-PCR y distribución de grupos filogenéticos de *E. coli* de Argentina**



El gráfico A, muestra la proporción de aislamientos, donde B2 presenta 5 aislamientos, mientras los grupos restantes presentan 4 aislamientos. El gráfico B presenta los patrones obtenidos por ERIC-PCR en aislamientos de *E. coli*, donde SM7 y SM8 presentan el mismo patrón de bandas.

#### 4.1.3 Detección de genes PMQR

En el grupo de aislamientos de Argentina, un 67,3 % (35/52) de los aislamientos productores de BLEE fueron positivos para al menos un gen de PMQR, 17 *K. pneumoniae*, 11 *E. coli*, 3 *P.mirabilis*, 2 *K. oxytoca*, 1 *E.*



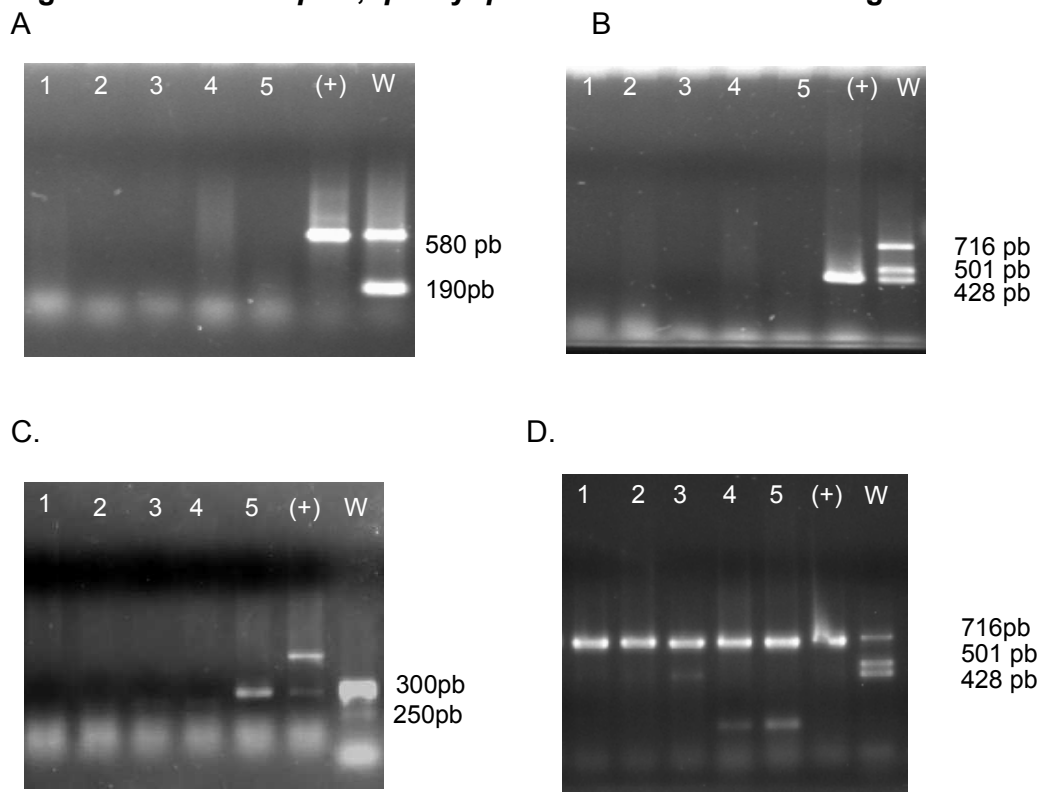
*cloacae* y una *Providencia* sp.; ninguno de los aislamientos productores de AmpC (5 aislamientos), presentó genes de tipo PMQR.

#### 4.1.3.1 Qnr

Aunque se evaluaron las distintas variantes de *qnr* (A, B, C, D, S y VC), la variante encontrada en este grupo fue *qnrB* encontrándose en un 36,8% (21/57), los demás *qnr* no fueron detectadas.

La Figura 21 muestra algunos de los ejemplos de los resultados obtenidos con sus controles positivos.

**Figura 21: PCR de *qnrA*, *qnrS* y *qnrB* en aislamientos de Argentina**



En la figura se muestran ejemplos de las PCR realizadas en los aislamientos de Argentina A) *qnrA*: calles del 1-5: T6-T10, B) *qnrS*: calles del 1-5: T6-T10; C) *qnrB*: calle1:C2; calle 2:N1; calle 3:N2; calle 4:CL1; calle 5: CL9. D) *qnrB* (con *primers* BIF: calle1:CL3; calle 2:CL4; calle 3:M2; calle 4:B4; calle 5: B5. Cada PCR contó con su control (+) y su control negativo; W: marcadores de peso.

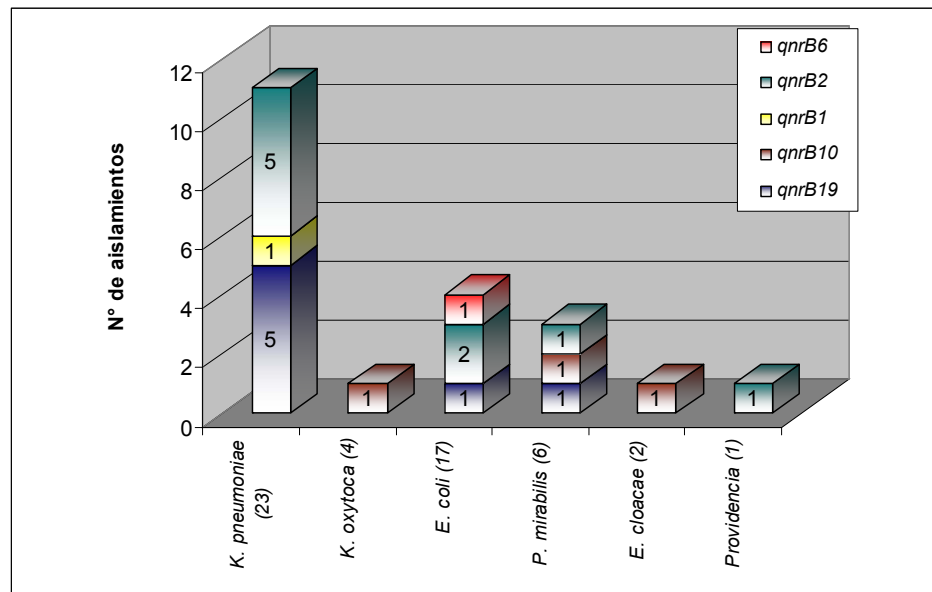
##### 4.1.3.1.1 *qnrB*

Los diferentes alelos de *qnrB* encontrados, están distribuidos entre las diferentes especies analizadas, principalmente en *K. pneumoniae* presentándose en el 47,8 % de los aislamientos de esta especie (11 de 23 aislamientos).

El alelo *qnrB2* presentó una frecuencia de 42,8 % (9/21), seguido de *qnrB19* (7/21), *qnrB10* (3/21), *qnrB6* (1/21) y *qnrB1* (1/21); la frecuencia

de los alelos encontrados y su relación con la especie bacteriana se observa en la Figura 22.

**Figura 22: Alelos de *qnrB* encontrados en los aislamientos de Argentina**



La figura muestra la distribución de los alelos *qnrB* en cada especie, (n): el número total de aislamientos por especie.

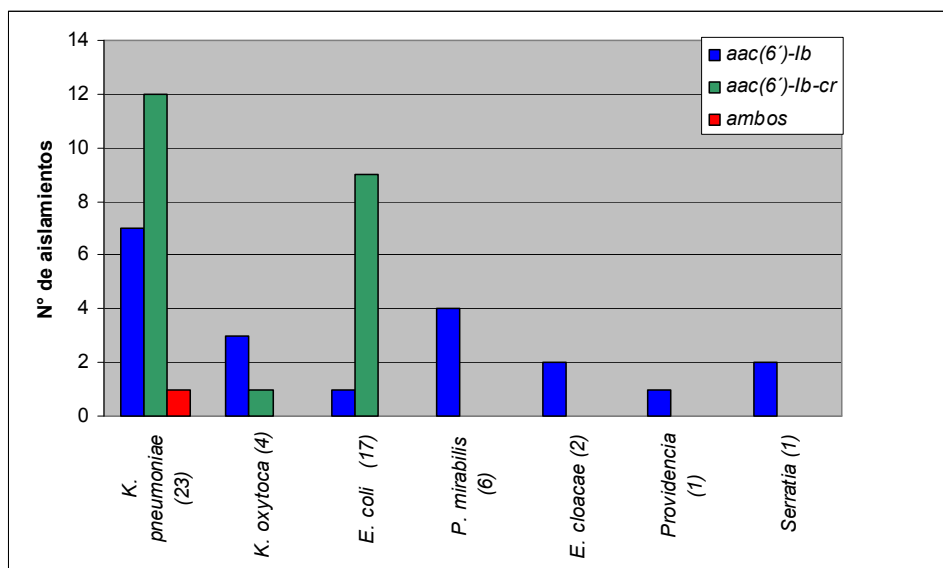
#### 4.1.3.2 *aac(6')-Ib-cr*

El gen *aac(6')-Ib-cr* se detectó en un 38,6 % (22/57), y *aac(6')-Ib* (no *cr*) en un 35,8 % (20/57); un aislamiento presentó ambos genes (CV1). En la Figura 24 se pueden observar el ejemplo de los amplicones obtenidos por PCR y RFLP para la detección de la variante de la enzima modificadora de aminoglicósidos.

En los aislamientos en los que se detectó gen *aac(6')-Ib-cr*, el 86% (19/22) mantenían el cambio nucleotídico de T306C, y solo tres aislamientos tenían la mutación silenciosa T306A (anexo V).

*aac(6')-Ib* fue encontrada en todas las especies analizadas mientras que su variante esencialmente en las *Klebsiellas* y *E.coli* (Figura 23).

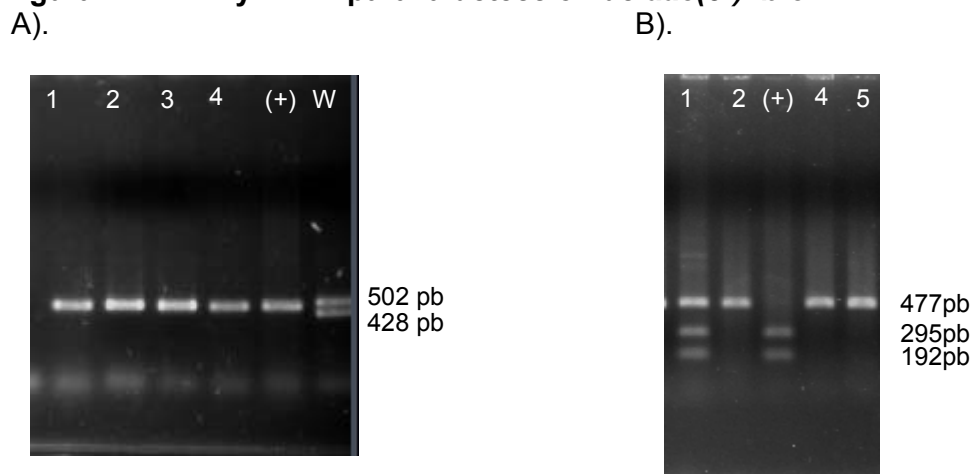
**Figura 23: Distribución de los genes *aac(6')-Ib* y su variante *aac(6')-Ib-cr* en Argentina**



La figura muestra la distribución del gen codificante de la enzima modificadora de aminoglicósidos y su variante *aac(6')-Ib-cr* en cada especie, (n): el número total de aislamientos por especie.

El comportamiento fenotípico de los aislamientos con la enzima modificadora de aminoglicósidos se puede observar en el apartado 4.4.

En 8 de los 22 aislamientos en los que fue detectado *aac(6')-Ib-cr* se encontró también al menos un alelo *qnrB* (5 *qnrB2*, 1 *qnrB19*, 1 *qnrB6* y 1 *qnrB1*). Cuando la enzima detectada fue *aac(6')-Ib* 9 de los 20 aislamientos portaban un *qnrB* (4 *qnrB19*, 3 *qnrB10* y 2 *qnrB2*). Solo 2 de 9 aislamiento que no tenían esta enzima evidenciaron el gen *qnrB* (1 *qnrB2* y 1 *qnrB19*).

**Figura 24: PCR y RFLP para la detección de *aac(6')-Ib-cr***

**A)** Ejemplo de amplificación del gen *aac(6)-Ib*: calle 1: CL2; calle 2: CL4 ;calle 3: CL3; calle 4:CL5. **B)** RFLP del producto de PCR con *BseGI*: el sitio de restricción de la enzima se pierde en el gen de la variante *aa(6')-Ib-cr*, calle 1: aislamiento CV1 portador de ambas variantes alélica. calle 2: CV2; calle 4: CM1, calle 5: CM2. (+) MM16: codifica para *aac(6')-Ib*, W: marcador de peso.

#### 4.1.3.3 Bombas de eflujo QepA y OqxAB

##### 4.1.3.3.1 QepA

No se encontró el gen *qepA* en ninguno de los 57 aislamientos del grupo RCTG.

Sin embargo, como se informa en el origen de las cepas, si se detecto en un aislamiento de *E. coli* SCTG de Argentina (denominado, B2), el alelo encontrado fue *qepA1* y su caracterización se halla detallada en el apartado 4.5.1

##### 4.1.3.3.2 OqxAB

Los genes codificantes para la bomba de eflujo OqxAB, fueron detectados en un 38,6% (22/57) de nuestros aislamientos (20 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca* y 1 *E. gergoviae*).

Corresponde mencionar que en forma separada, *oqxA* se detectó en un 43,8 % (25/57) de los aislamientos y *oqxB* en el 45,6 % (26/57). Esta diferencia radica, en que algunos aislamientos resultaron positivos solo para uno de los componentes de la bomba, siendo 4 aislamientos *oqxA*(+), *oqxB*(-) (1 *K. pneumoniae*, 1 *K. oxytoca*, 1 *E. coli* y 1 *Providencia* sp.) y 4 aislamientos *oqxA*(-), *oqxB*(+)(1 *K. oxytoca*, 1 *E. coli* y 2 *E. cloacae*).

##### 4.1.3.4 PMQR y BLEE

Se recuerda que 52/57 aislamientos fueron productores de alguna BLEE y los 5 aislamientos restantes eran productores de una AmpC; ninguno de estos últimos portaba genes de tipo PMQR.

Dentro de los aislamientos productores de BLEE, el 94 % (49/52) fueron positivos para CTX-M, siendo la enzima más prevalente CTX-M-2 en un 44% (23/52) y CTX-M-15 en un 32.6%(18/52).

En la

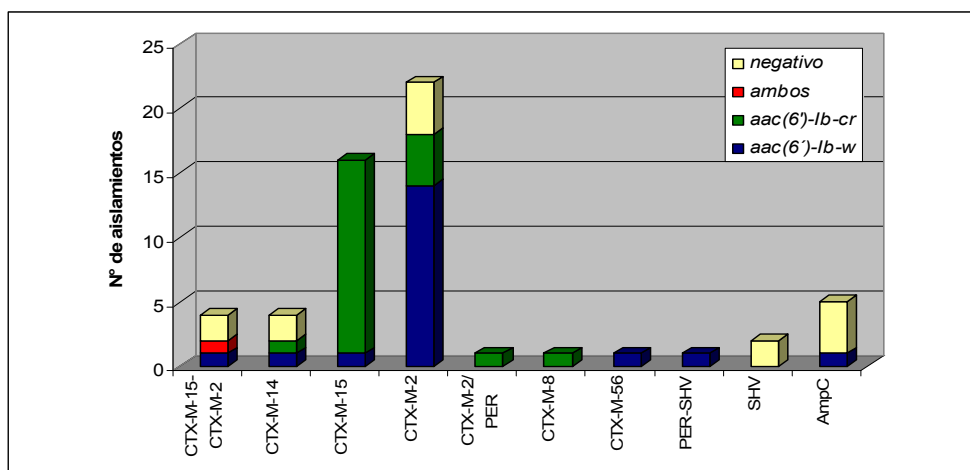
Tabla 20 se puede observar la relación entre cada alelo de *qnrB* y BLEE. El 34,7% (8/23) de *K. pneumoniae* que poseen *qnrB*, presentan el alelo *bla*<sub>CTX-M-15</sub>.

**Tabla 20: Relación BLEE y los alelos de *qnrB***

Alelo <i>qnrB</i>	Especie	BLEE
<i>qnrB2</i> (9)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M15</sub> (5)
	<i>P. mirabilis</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M2</sub> (1)
	<i>Providencia sp</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M2</sub> (1)
	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M14</sub> (2)
<i>qnrB19</i> (7)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M15</sub> (1)
		<i>bla</i> <sub>CTX-M2</sub> (3)
		<i>bla</i> <sub>CTX-M15</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M2</sub> (1)
	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M14</sub> (1).
<i>qnrB10</i> (3)	<i>P. mirabilis</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M2</sub> (1)
	<i>K. oxytoca</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M2</sub> (1)
	<i>E. cloacae.</i>	<i>bla</i> <sub>PER-2</sub> / <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> (1)
<i>qnrB6</i> (1)	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M2</sub> (1)
<i>qnrB1</i> (1)	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M15</sub> (1)

La relación entre las enzimas acetilantes modificadora de aminoglicósidos y los aislamientos productores de BLEE se puede observar en la Figura 25 Se destaca un predominio del gen *aac(6')-Ib-cr* en los aislamientos productores de CTX-M-15 y del gen *aac(6')-Ib* en aquellos productores de CTX-M-2 Tabla 22

**Figura 25: Relación entre *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr* y  $\beta$ -lactamasas .de espectro extendido.**



En la figura se muestra el número de aislamientos relacionando los diferentes tipos de BLEE y la presencia de gen *aac(6')-lb* y su variante *aac(6')-lb-cr*. La variable “negativo” se refiere a que no se detectó por PCR esta enzima y la variable ambos se refiere a un aislamiento que presentó tanto *aac(6')-lb-cr*, como *aac(6')-lb*. los aislamientos que presentaron AmpC solo presentaron el gen *aac(6')-lb* en cualquiera de sus variables diferentes a *cr*.

En los aislamientos de *E. coli* portadores de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> de la Tabla 22, se observan la presencia de dos grupos filogenéticos: A (2/7) y B2 (5/7) donde todos los aislamientos del grupo B2 mostraron un perfil de amplificación similar por rep-PCR y pertenecían al ST131.

Adicionalmente, 5/10 *K. pneumoniae* portadores de *bla*<sub>CTX-M-15</sub> se caracterizaron como ST11, en donde todas las *K. pneumoniae* ST11 poseen el gen *aac(6')-lb-cr* y 3/5 un gen *qnrB* (2 *qnrB2* y 1 *qnrB19*).

Finalmente, cabe destacar que se presentaron diferencias en los valores de CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> a las fluoroquinolonas al comparar las *K. pneumoniae* portadoras de algún gen PMQR (sin considerar la presencia de *oqxAB*), con aquellas que no lo poseen; estos resultados se pueden observar en la Tabla 21. Por el contrario, no se observaron diferencias de CIM en los aislamientos de *E. coli*.

**Tabla 21: CIM<sub>50</sub> y CIM<sub>90</sub> en *K. pneumoniae***

PMQR	CIM <sub>50</sub> (µg/ml)			CIM <sub>90</sub> (µg/ml)		
	CIP	LEV	GAT	CIP	LEV	GAT
Positivos (n = 17)	>64	16	16	>64	>64	64
Negativos (n = 6)	1	1	1	8	4	4



**Tabla 22: Principales características de los aislamientos PMQR Argentina**

Especie	Aislamiento	Ciudad	Hospital	Alelo <i>qnrB</i>	<i>aac(6')-Ib/</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i>	Gen tipo BLEE	Grupo filogenético / clon	ST	CIM (µg/ml)						
									NAL	CIP	LEV	GAT	GEN	TOB	AMK
<i>K. pneumoniae</i>	CM4	CAB	H6	<i>qnrB2</i>	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	nc / Kp1	ST11	>512	>64	32	16	32	4	4
	CL4	CAB	H1	<i>qnrB2</i>	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	nc / Kp1	ST11	>512	>64	>64	64	>64	16	4
	I3	SF	H5	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	nc / Kp1	ST11	>512	>64	16	16	>64	32	4
	I4	SF	H5	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	nc / Kp1	ST11	>512	>64	16	16	64	16	4
	CL6	CAB	H1	<i>qnrB2</i>	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	nc / Kp2	Nd	>512	>64	16	8	1	16	4
	CL9	CAB	H1	<i>qnrB1</i>	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	nc / Kp3	Nd	64	4	1	2	32	16	2
	T8	CH	H10	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	nc / Kp4	Nd	>512	64	32	16	64	32	4
	CV1	CAB	H7	<i>qnrB19</i>	+ / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> / <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	nc / Kp5	ST11	>512	>64	64	32	>64	64	32
	L5	CAB	H3	<i>qnrB19</i>	- / -	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	nc/ Kp6	ST392	>512	>64	4	4	2	16	8
	B4	CAB	H4	<i>qnrB2</i>	- / -	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	nc/ Kp2	Nd	>512	64	>64	64	0,5	1	1
	CV2	CAB	H7	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	nc/ nd	ST15	>512	64	8	4	<0,5	4	4
	CM1	CAB	H6	<i>qnrB19</i>	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	nc/ nd	ST11	>512	>64	64	32	>64	>64	> 256
	B5	CAB	H4	<i>qnrB19</i>	- / -	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	nc/ nd	ST11	>512	64	64	64	>64	>64	>256
	CL7	CAB	H1	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	nc/ nd	ST11	>512	>64	16	16	1	8	8
	M2	CABA	H7	<i>qnrB19</i>	- / -	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	nc/ nd	Nd	>512	>64	>64	64	2	16	>256
CL5	CAB	H1	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	nc/ nd	ST14	64	8	2	4	1	16	8	
R1	SF	H11	<i>qnrB2</i>	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	nc/nd	Nd	>512	>64	64	32	64	16	Nd	
<i>E. coli</i>	L4	CAB	H3	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	B2/EC1a	ST131	>512	>64	16	16	1	16	8
	T1	CH	H10	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	B2/EC1a	ST131	>512	>64	64	16	>64	>64	16



	CM2	CAB	H6	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	B2/EC1b	ST131	>512	>64	8	8	>64	32	8
	T3	CH	H10	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	B2/EC1b	ST131	>512	64	32	8	1	1	2
	SM5	BA	H2	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	B2/EC1c	ST131	512	2	1	0,5	2	16	4
	M1	CAB	H7	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	A/EC2	ST410	>512	>64	32	16	>64	64	32
	SM4	BA	H2	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	A/EC3	ST167	>512	>64	64	32	2	16	16
	T2	CH	H10	<i>qnrB6</i>	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	B1/ EC4	ST297	>512	>64	>64	>64	2	32	4
	SM7	BA	H2	<i>qnrB2</i>	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	D/ EC5	ST68	>512	>64	>64	32	1	1	4
	SM8	BA	H2	<i>qnrB2</i>	- / -	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	D/ EC5	ST68	>512	>64	64	32	<0,5	0,5	0,5
	R2	SF	H11	<i>qnrB19</i>	- / -	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	B1/nd	Nd	>512	64	16	16	<0,5	1	Nd
<i>K. oxytoca</i>	C1	SF	H9	-	- / +	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	nc/ nd	Nd	128	2	4	2	8	16	2
	T4	CH	H10	<i>qnrB10</i>	- / -	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	nc/ nd	Nd	>512	64	32	16	>64	>64	16
<i>P. mirabilis</i>	SM6	BA	H2	<i>qnrB2</i>	- / -	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	nc/ nd	Nd	>512	>64	>64	64	32	8	4
	CX2	BA	H8	<i>qnrB10</i>	- / -	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	nc/ nd	Nd	128	2	4	2	8	16	32
	T12	CH	H10	<i>qnrB19</i>	- / -	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	nc/ nd	Nd	>512	32	8	32	64	32	4
<i>Providencia</i> sp.	CL2	CAB	H1	<i>qnrB2</i>	- / -	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	nc/ nd	Nd	>512	>64	>64	>64	>64	64	1
<i>E. cloacae</i>	CX1	BA	H8	<i>qnrB10</i>	- / -	<i>bla</i> <sub>PER-2 /</sub> <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	nc/ nd	Nd	128	2	4	2	8	16	4

nc: no corresponde, nd: no determinado. NAL: ácido nalidixico, CIP: ciprofloxacina, LEV: levofloxacina, GAT: gatifloxacina, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina; AMK: amicacina. CAB: Ciudad Autónoma de Buenos Aires, BA: Buenos Aires, SF: Santa Fe, CH: Chubut. H1-H8: Hace referencia a los diferentes hospitales de los cuales provienen los aislamientos.

## 4.2. Perú

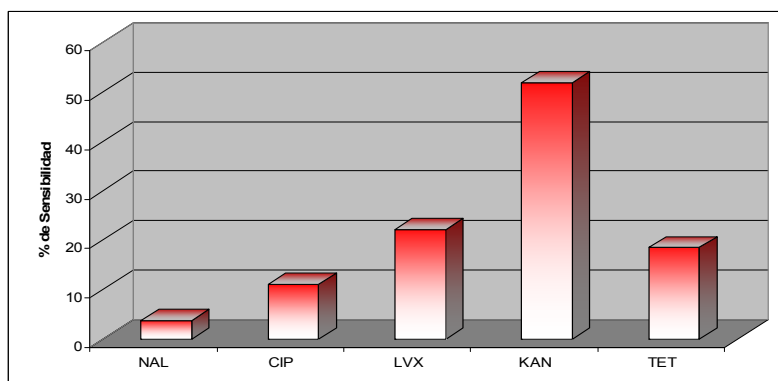
Este grupo comprende, 27 aislamientos de *Enterobacteriaceae* RCTG, recolectados en Lima, Perú durante en mes de enero del año 2011, 14 *E. coli*, 11 *K. pneumoniae*, 1 *P. mirabilis*, 1 *Serratia* sp.

### 4.2.1 Sensibilidad antibiótica

#### 4.2.1.1 Antibiograma por difusión

Los microorganismos recibidos de Perú, fueron en general muy resistentes presentando un porcentaje de sensibilidad a NAL fue del 3,7 % (1/27), a CIP del 11,1 % (3/27), LVX del 22,2 % (6/27), a KAN 51,8 % (14/27) y a TET de 18,5 % (5/27) (Figura 26).

**Figura 26: Sensibilidad por antibiograma de los aislamientos de Perú**

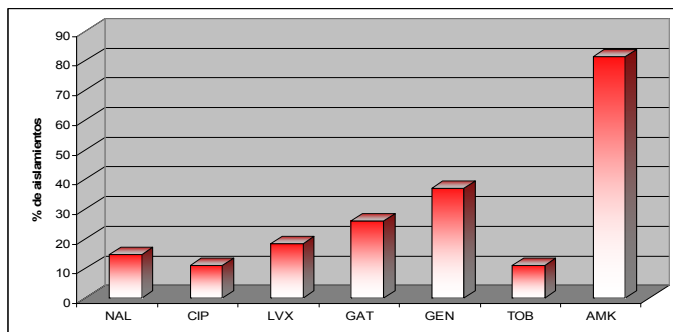


La figura muestra el porcentaje de sensibilidad en los aislamientos de Perú.

#### 4.2.1.2 Concentracion inhibitoria minima

La CIM en medio sólido arrojó los siguientes resultados: el porcentaje de sensibilidad a NAL fue de 14,8 % (4/27), superior al obtenido por antibiograma; la sensibilidad a CIP fue la misma que por antibiograma y para LVX fue ligeramente menor 18,5 % (5/27), se presentó un 25,9 % (7/27) de sensibilidad a GAT y un 37 % (10/27) a GEN (ver, Figura 27)

**Figura 27: Sensibilidad por CIM de los aislamientos de Perú**

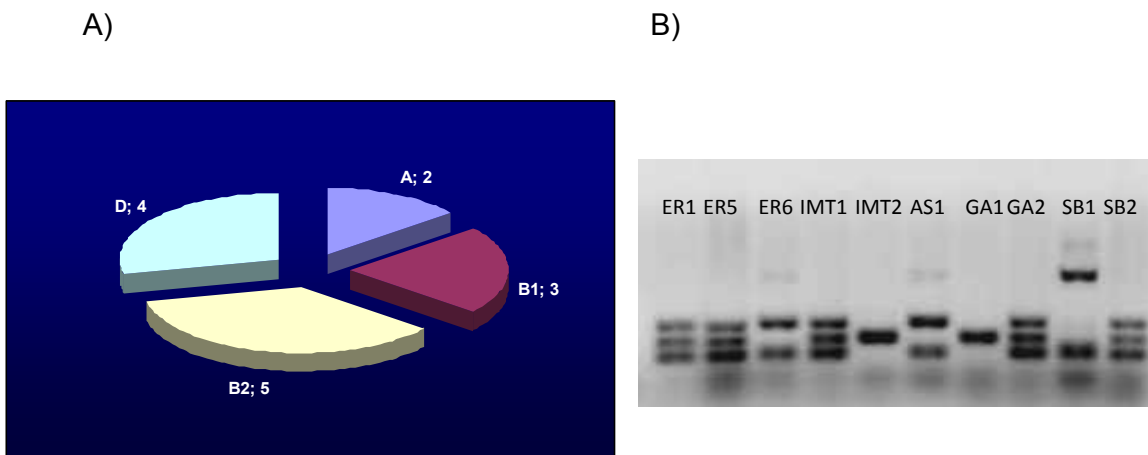


La figura muestra el porcentaje de sensibilidad presentado en los aislamientos de Perú.

#### 4.2.2 Tipificación de la Población

El grupo filogenético de los 14 aislamientos de *E. coli*, se presenta en la Figura 28, siendo el más prevalente el grupo filogenético B2.

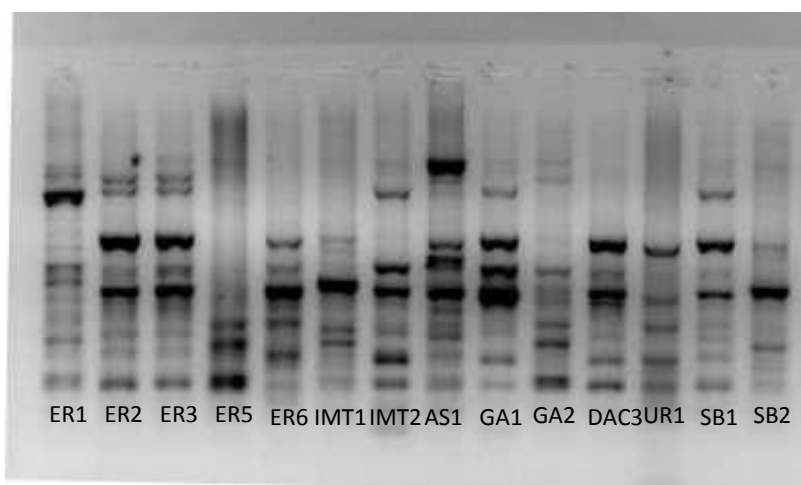
**Figura 28: Distribución de los grupos filogenéticos en *E. coli* Perú**



El gráfico A, muestra la proporción de aislamientos, donde B2 el mayor número de aislamientos, seguido de D, B1 y A. El gráfico B muestra un ejemplo de los patrones obtenidos por PCR que permite clasificar cada grupo filogenético como se describe en el apartado 3.9.

El análisis realizado por rep-PCR<sup>23</sup> mostró una población heterogénea, donde ER2 y ER3 fueron los únicos aislamientos que presentaron el mismo patrón de amplificación, y sugiere identidad clonal. En la Figura 29, se observa el patrón de ERIC-PCR de este grupo de aislamientos.

**Figura 29: ERIC de los aislamientos de *E. coli* de Perú**

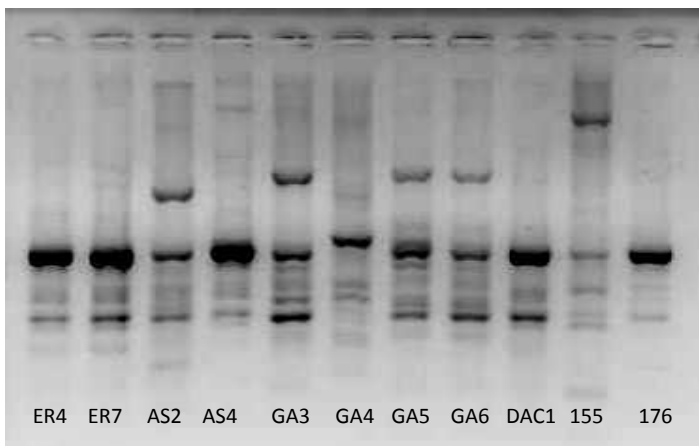


La figura muestra los patrones obtenidos por ERIC-PCR en los aislamientos de *E. coli* de la población de Perú.

<sup>23</sup> Se refiere tanto a ERIC como a REP-PCR

Por otro lado, al observar los patrones de amplificación obtenidos en los aislamientos de *K. pneumoniae* mediante rep-PCR muestran que tres aislamientos presentaron el mismo patrón ER4, ER7 y DAC1 Figura 30.

**Figura 30: ERIC de los aislamientos de *K. pneumoniae* de Perú**



La figura muestra los patrones obtenidos por ERIC-PCR en los aislamientos de *K. pneumoniae* de la población de Perú

#### 4.2.3 Mutaciones Cromosomales en *QRDR*

Las mutaciones cromosomales encontradas en los genes *gyrA* y *parC* se presentan en la Tabla 23.

Todas las *E. coli*, presentaron doble mutación en *GyrA* (S83L y D87N); mientras que en *ParC* todos presentaron la mutación S80I y tres aislamientos presentaron, además, un cambio adicional al anterior, donde en dos de ellos se observó la sustitución E84V y el restante mostró A108V.

Los cambios detectados en *GyrA* dentro del grupo de las *K. pneumoniae*, fueron los siguientes: 2 aislamientos con S83I, 4 con S83F y D87A y 2 aislamientos con tres sustituciones aminoacídica (uno con S83Y, D87H y R154K, y el otro S83L, D87N y R154K) en *ParC* el cambio se presentó en S80I.

Tres aislamientos de *K. pneumoniae* no mostraron mutaciones en las topoisomerasas.

El aislamiento de *Serratia* no amplificó con los *primers* utilizados en este estudio, lo mismo ocurrió con el fragmento de *parC* en *P. vulgaris*.

#### 4.2.4 Detección de genes PMQR

Dentro de los aislamientos de Perú, el 85,2 % (23/27) presentó al menos un gen de tipo PMQR: 11 *E. coli*, 11 *K. pneumoniae* y 1 *Serratia* sp. El gen *aac(6')-Ib-cr* se presentó en un 55,5 % (15/27) y 3 de ellos presentaron a su vez genes de tipo *qnrB* concomitante con la variante *aac(6')-Ib-cr* (2

*qnrB1*, 1 *qnrB19*). Los genes *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrVC* no fueron detectados. Dentro de esta población no se detectó el gen *aac(6)-Ib*.

El determinante de resistencia *qnrB* fue detectado en siete aislamientos, de los cuales 6 se detectaron en *K. pneumoniae* y uno en *Serratia* sp. (5 *qnrB19* y 2 *qnrB1*).

En el aislamiento de *Serratia* sp. se detectó el alelo *qnrB19* el cual fue obtenido por clonación el vector pJET. El proceso realizado con este aislamiento se describe en el anexo V

El alelo de *qnrS* en el único aislamiento positivo no pudo determinarse con exactitud ya que el fragmento del amplicón secuenciado (428 bp / 650 bp del gen completo) no permite diferenciar entre *qnrS1* o *qnrS3*.

En este grupo se detectaron también aislamientos portadores de las bombas de eflujo de interés, correspondientes a *OqxAB* y a *QepA*.

Un aislamiento de *E. coli* fue portador de *qepA1*(1/27).

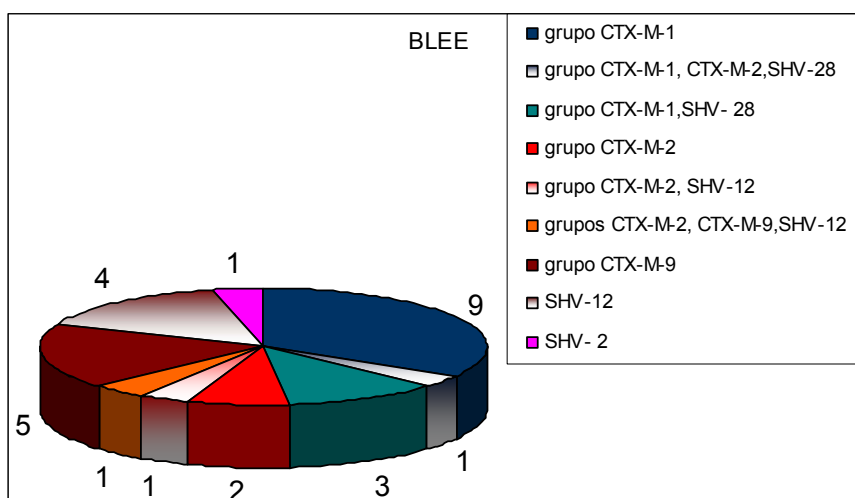
Tanto *oqxA*, como *oqxB* fueron detectados en un 40,7 % (11/27) de los aislamientos, donde tres de ellos pertenecen a la especie *E. coli* (ER1, ER2 y DAC3) y los restantes 8 a *K. pneumoniae*.

La caracterización de los aislamientos de *E. coli* con *qepA1* y *oqxAB* se encuentra en el apartado 4.5, La tabla con las características de los aislamientos con PMQR pueden observarse en la Tabla 23.

#### 4.2.5 PMQR y BLEE

En todos los aislamientos del grupo de Perú se detectaron BLEE, de los cuales la mayor frecuencia la presentó CTX-M del grupo 1 como única enzima con el 33,7 % (9/27); seguido de CTX-M del grupo 9 (5/27) y CTX-M del grupo 2 (2/27). La distribución de las BLEE se observa en la Figura 31.

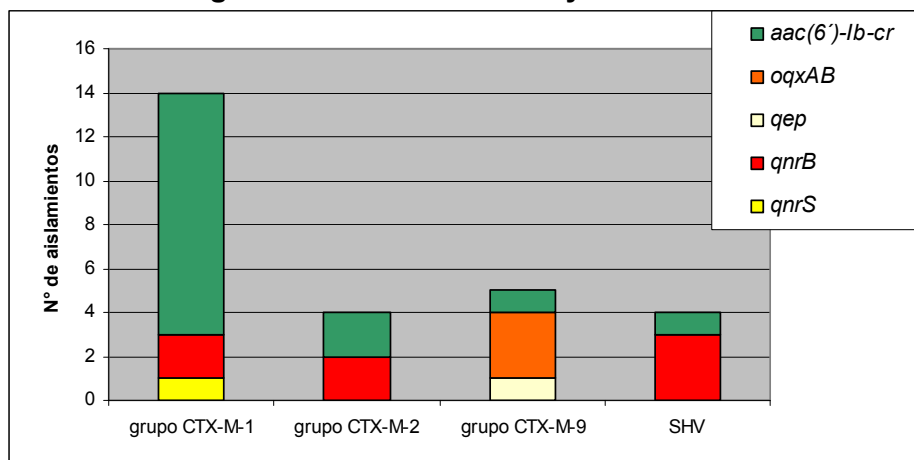
**Figura 31: Distribución de BLEE en los aislamientos de Perú**



La figura muestra la proporción de aislamientos con cada tipo de BLEE (sola o combinada con otras).

La relación entre las BLEE detectadas y los PMQR pueden observarse en la Figura 32, donde se observa que la mayor proporción de *aac(6)-Ib-cr*, se encuentra en los aislamientos en los que se detectó CTX-M del grupo 1. Las bombas de eflujo de codificación plásmidica se presentaron en los aislamientos con CTX-M del grupo 9.

**Figura 32: Relación BLEE y PMQR Perú**



En la gráfica se observa la relación entre BLEE y PMQR detectada en los aislamientos de Perú, en *oqxAB* solo se relacionó los aislamientos de *E. coli*.



Resultados

**Tabla 23: Características de los aislamientos de Perú**

Especie	Aislamientos	grupo filogenético	BLEE	GyrA	ParC	PMQR	CIM (µg/ml)							antibiograma :ZI (mm)
							NAL	CIP	LVX	GAT	AMK	GEN	TOB	K
<i>E. coli</i>	ER1	B2	CTX-M grupo1	S83L, D87N	S80I	<i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	32	8	4	4	32	32	21
	SB2	B2	CTX-M grupo1	S83L, D87N	S80I	<i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	8	8	8	4	2	0,5	16
	ER6	D	CTX-M grupo1	S83L, D87N	S80I,	<i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	>32	32	32	8	32	64	20
	IMT1	B2	CTX-M grupo1	S83L, D87N	S80I	<i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	>32	8	8	2	2	16	19
	IMT2	A	CTX-M grupo1	S83L D87N	S80I	<i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	>32	32	32	4	2	16	19
	ER5	B2	CTX-M grupo1	S83L, D87N	S80I, E84V,	<i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	>32	8	8	4	2	64	17
	ER3	D	CTX-M grupo 9 : CTX-M-65	S83L D87N	S80I,	<i>oqxAB, aa(6')-Ib-cr</i>	>512	32	32	64	8	16	32	24
	ER2	B1	CTX-M grupo 9 : CTX-M-65	S83L, D87N	S80I,	<i>oqxAB</i>	>512	32	32	32	4	16	32	26
	DAC3	B1	CTX-M grupo 9 : CTX-M-65	S83L, D87N	S80I	<i>oqxAB</i>	>512	32	32	32	2	16	16	28
	GA2	B2	CTX-M grupo1	S83L, D87N	S80I, E84V	<i>qnrS</i>	>512	16	8	4	4	64	8	21
	UR1	D	CTX-M grupo 9 : CTX-M-14	S83L, D87N	S80I	<i>Qep</i>	>512	>64	64	64	1	>64	32	23
	SB1	B1	CTX-M grupo 1	S83L, D87N	S80I	-	>512	8	8	8	2	1	1	11
	AS1	D	CTX-M grupo 2	S83L, D87N	S80I,	-	>512	4	4	4	2	16	8	6
	GA1	A	SHV12	S83L, D87N	S80I, A108V*	-	>512	2	0,25	0,25	1	1	16	14

SC: SIN CAMBIO, \* Cambio en regiones fuera de QRDR,-: No encontrado. Se marca en rojo los cambios más notables y subrayado los valores que indican sensibilidad a quinolonas y fluoroquinolonas.



Resultados

Tabla 25: Características de los aislamientos de Perú

Especie	Aislamientos	grupo filogenético	BLEE	GyrA	ParC	PMQR	CIM (µg/ml)							antibiogr ama:Zl (mm)
							NAL	CIP	LVX	GAT	AMK	GEN	TOB	K
<i>K. pneumoniae</i>	<b>AS4</b>	ND	CTX-M grupo1+ SHV 28	S83F D87A	S80I	<i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	16	4	<u>2</u>	2	2	16	11
	<b>176</b>	ND	SHV2	S83I	S80I	<i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	16	8	4	8	64	64	24
	<b>DAC1</b>	ND	CTX-M grupo1 Y 2 SHV 28	S83F, D87A	S80I	<i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	32	8	2	16	1	32	8
	<b>155</b>	ND	CTX-M grupo 2	S83Y, D87H, R154K*	S80I	<i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	>32	32	8	>64	>64	>64	12
	<b>GA4</b>	ND	CTX-M grupo1	S83L, D87N, R154K*	S80I	<i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	>64	8	8	4	1	16	19
	<b>ER4</b>	ND	CTX-M grupo1+ SHV 28	S83F, D87A	S80I	<i>qnrB1</i> , <i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	>32	32	8	8	16	32	19
	<b>ER7</b>	ND	CTX-M grupo1+ SHV 28	S83F, D87A	S80I	<i>qnrB1</i> , <i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	>32	16	8	8	32	32	18
	<b>AS2</b>	ND	CTX-M grupo 2+ SHV12	S83I	S80I	<i>qnrB19</i> , <i>aa(6')-Ib-cr</i>	>512	>32	>64	32	>64	>64	32	6
	<b>GA5</b>	ND	SHV 12	SC	SC	<i>qnrB19</i>	<u>16</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	32	64	32	11
	<b>GA6</b>	ND	CTX-M grupo 2	SC	SC	<i>qnrB19</i>	<u>16</u>	<u>0,5</u>	1	1	64	32	32	12
<b>GA3</b>	ND	SHV 12	SC	SC	<i>qnrB19</i>	<u>4</u>	<u>0,5</u>	<u>0,5</u>	<u>0,5</u>	1	2	0,5	24	
<i>Serratia</i> sp	<b>134</b>	ND	SHV	ND	ND	<i>qnrB19</i>	<u>8</u>	<u>0,25</u>	<u>0,5</u>	<u>0,5</u>	>64	32	64	9
<i>Proteus vulgaris</i>	<b>DAC2</b>	ND	CTX-M grupo 9	S83I N133H*	ND	-	>512	8	8	8	>64	32	64	9

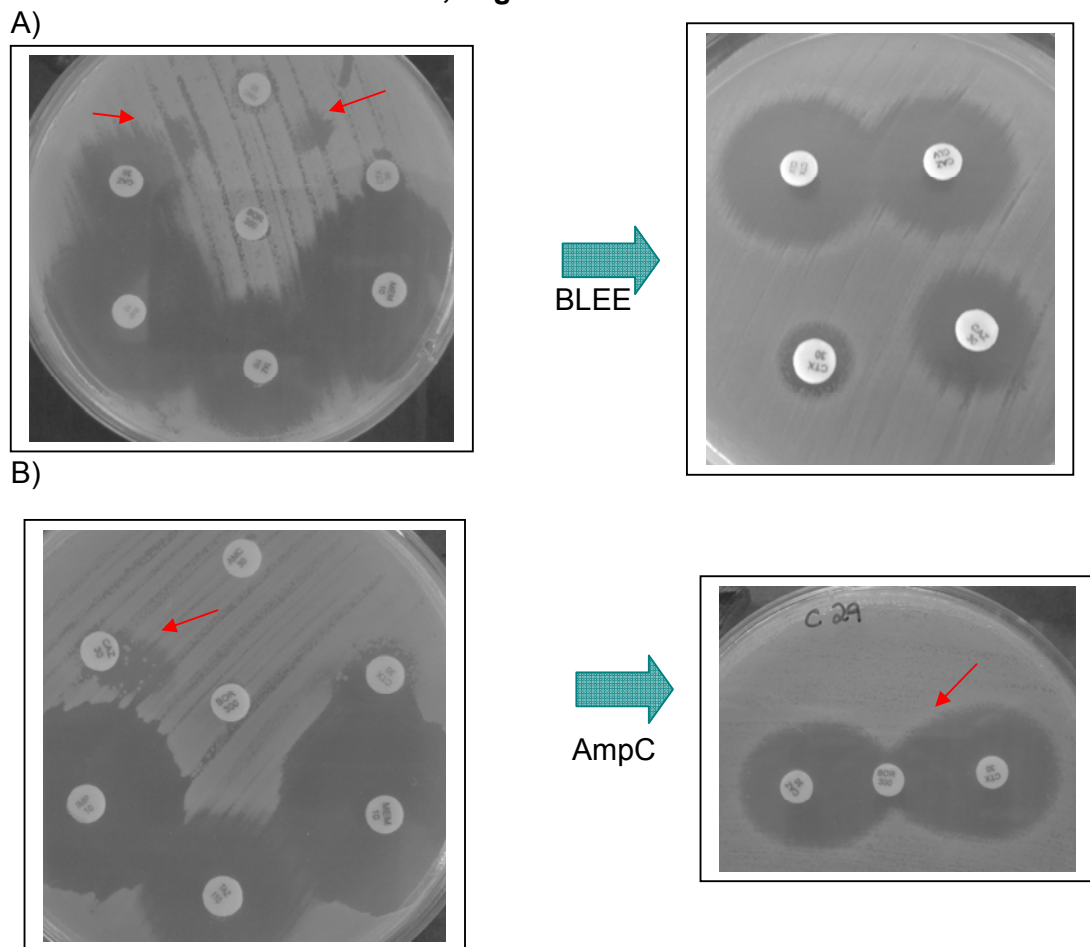
SC: SIN CAMBIO, \* Cambio en regiones fuera de QRDR,-: No encontrado. Se marca en rojo los cambios más notables y subrayado los valores que indican sensibilidad a quinolonas y fluoroquinolonas.

### 4.3. Colombia

Los 55 aislamientos recibidos fueron subdivididos de acuerdo a si presentaban resistencia a al menos una cefalosporina de tercera generación, donde un 42 % (23 /55) fueron RCTG y el 58 % restante (32/55) presento SCTG.

En el grupo RCTG se determinó fenotípicamente en 21 aislamientos la presencia de BLEE, 1 aislamiento presentó simultáneamente BLEE y AmpC y 1 aislamiento sólo AmpC. Ejemplos de la detección y confirmación fenotípica de BLEE y AmpC se pueden observar en la Figura 33.

**Figura 33 Antibiograma por difusión en medio sólido y pruebas confirmatorias, según SABEBAC-AAM**



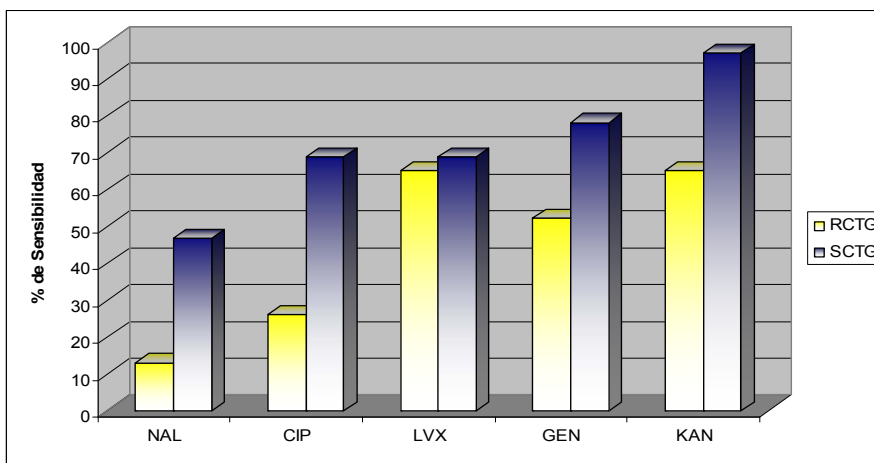
Se observa en la figura A) la inhibición por el ácido clavulánico, en la prueba confirmatoria se aumenta la zona de inhibición en mas de 5 mm, (B) la sinergia causada por el borónico. La flecha roja indica la sinergia.

### 4.3.1 Sensibilidad antibiótica

#### 4.3.1.1 Antibiógrama por difusión

La sensibilidad a quinolonas y algunos aminoglicósidos solo fue analizada mediante antibiógramas por difusión; tal como era de esperarse, se observó que en general, la resistencia fue mayor en el grupo de RCTG que en el de SCTG. Figura 34.

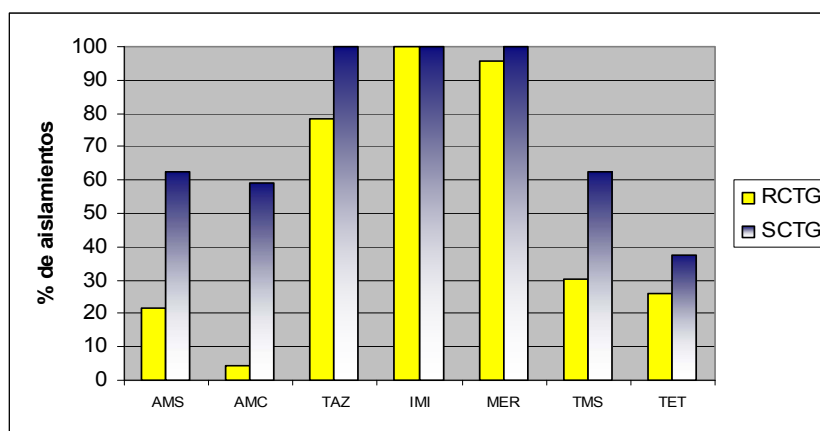
**Figura 34: Sensibilidad en los aislamientos de Colombia**



En la figura se muestra el porcentaje de aislamientos sensibles al grupo de quinolonas, fluoroquinolonas y aminoglicósidos ensayados sobre los aislamientos RCTG y SCTG.

Es interesante la detección de un aislamiento resistente a meropenem, pero sensible a imipenem (Figura 35).

**Figura 35: Perfil de sensibilidad a otros antibióticos de los aislamientos de Colombia**

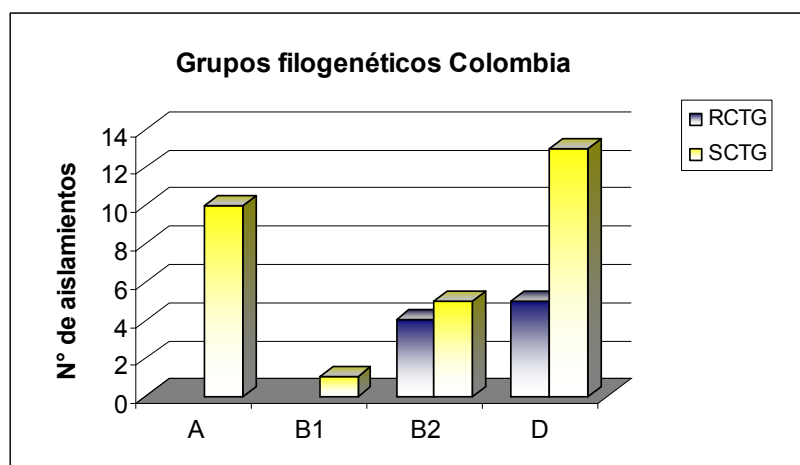


En la gráfica se compara el porcentaje de sensibilidad de los microorganismos agrupados según su resistencia a cefalosporinas de tercera generación.

#### 4.3.2 Tipificación de la población

Las *E. coli* de Colombia presentan una distribución de grupos filogenéticos diferente a la encontrada en Perú y Argentina, en este caso los aislamientos RCTG se agrupan principalmente en los grupos B2 y D mientras que los aislamientos SCTG (aunque se presenta una mayor frecuencia de los grupos A y D), se encuentran distribuidos en todos los grupos (Figura 36).

**Figura 36: Grupos filogenéticos en aislamientos de *E. coli***



En esta figura se observa el número de aislamiento por cada uno de los grupos filogenético de *E. coli* en las dos poblaciones de estudio de Colombia.

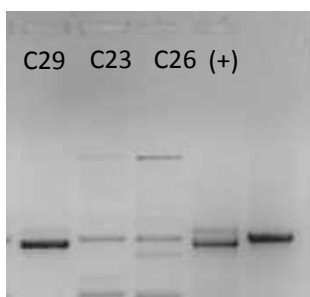
#### 4.3.3 Detección de genes PMQR.

En el grupo RCTG de Colombia, el 82,6 % (19/23) de los aislamientos presentaron al menos un gen de tipo PMQR, por otro parte en los aislamientos SCTG este porcentaje fue de 28,1 % (9/32) siendo esta diferencia significativa ( $p=0,0001$ )<sup>24</sup>.

El 47,8 % (11/23) del grupo RCTG mostró *qnrB*, los alelos detectados fueron *qnrB1* (8 aislamientos, todos *K. pneumoniae*) y *qnrB19* (2 *K. pneumoniae* y 1 *E. coli*). En el grupo SCTG solo se detectó *qnrB1* en un aislamiento de *E. coli*.

El gen *qnrS* se detectó en una *E. coli* (RCTG) e igual que en el aislamiento de Perú el alelo no pudo determinarse con exactitud por que el fragmento secuenciado no permite diferenciar entre *qnrS1* o *qnrS3*. En la Figura 37 se observa la amplificación del gen.

<sup>24</sup> Fisher's exact test

**Figura 37: amplificación por PCR *qnrS***

C29: positivo para *qnrS*, C23 y C26 fragmentos inespecíficos. (+) control positivo de PCR. La última calle de izquierda a derecha, tiene un amplicon de tamaño conocido (500 pb)

El gen *aac(6')-Ib-cr* fue detectado en un 65,2 % (15/23) en el grupo RCTG, mientras en el grupo de SCTG solo en un 18,7 % (6/32). (Tabla 25). La asociación entre RCTG y presencia de este gen es significativa ( $p=0,0007$ )<sup>25</sup> entre la presencia de este determinante y la RCTG. En ninguno de los dos grupos se detectaron otras variables alélicas de *aac(6')-Ib*.

Por otro lado, en el grupo RCTG, 9/15 aislamientos *aac(6')-Ib-cr* positivos presentaron genes de tipo *qnrB* en forma concomitante (7 *qnrB1*, 2 *qnrB19*).

*qepA* fue detectado en un solo aislamiento (del grupo RCTG), La detección de la bomba de eflujo se presentó en un aislamiento productor de CTX-M-2 y con una AmpC del cluster CIT (Figura 43).

El alelo encontrado en C27 fue diferente a los reportados (*qepA1* y *qepA2*) por dos sustituciones. La caracterización más detallada de este aislamiento se encuentra en el apartado 4.5.1.

La bomba de expulsión codificada por *oqxAB* se detectó en los aislamientos de *K. pneumoniae* en 12 de 14 en el grupo RCTG y en 2 de 3 en el grupo SCTG. (Tabla 25).

#### 4.3.4 PMQR y BLEE/ AmpC

Como se mencionó anteriormente, 23 aislamientos (21 BLEE, 1 BLEE + AmpC y 1 AmpC) de Colombia fueron RCTG. En ellos, se detectaron 11 *qnrB* (8 *qnrB1* y 3 *qnrB19 like*), 15 *aac(6')-Ib-cr*, 1 *qepA* y 1 *qnrS*.

Las características de los aislamientos con PMQR se detallan en la Tabla 24

<sup>25</sup> Fisher's exact test  $p=0,0007$ .

**Tabla 24: Características de los aislamientos con PMQR de Colombia**

Especie	Aislamiento	grupo filogenético	PMQR	Fenotipo	antibiograma:ZI (mm)				
					NAL	CIP	LVX	GEN	K
<i>E. coli</i>	C2	B2	<i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	6	6	7	6	15
	C12	D	<i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	6	6	6	6	20
	C14	D	<i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	6	6	7	22	16
	C19	D	<i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	6	6	7	6	20
	C25	D	<i>qnrB19 like</i>	BIEE	6	31	25	23	28
	C27	B2	<i>qepA</i>	BIEE AmpC	26	28	24	28	30
	C29	D	<i>qnrS like</i>	AmpC	6	29	24	30	26
	C37	D	<i>qnrB1</i> <i>aac(6')-lb-cr</i>	SCTG	28	34	32	21	28
	C5	D	<i>aac(6')-lb-cr</i>	SCTG	6	6	10	11	20
	C46	B2	<i>aac(6')-lb-cr</i>	SCTG	6	6	6	20	23
	C49	B2	<i>aac(6')-lb-cr</i>	SCTG	6	6	6	26	18
	C50	B2	<i>aac(6')-lb-cr</i>	SCTG	6	6	6	24	23
C58	A	<i>aac(6')-lb-cr</i>	SCTG	6	6	6	11	11	
<i>K. pneumoniae</i>	C1	NC	<i>qnrB1</i> <i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	15	16	19	17	19
	C3	NC	<i>qnrB1</i> <i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	18	19	23	17	19
	C8	NC	<i>qnrB19 like</i> <i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	6	11	18	17	16
	C9	NC	<i>qnrB1</i>	BIEE	17	20	21	6	26
	C17	NC	<i>qnrB19 like</i> <i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	12	11	19	16	18
	C21	NC	<i>qnrB1</i> <i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	17	19	23	6	18
	C38	NC	<i>qnrB1</i> <i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	6	8	11	20	18
	C40	NC	<i>qnrB1</i> <i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	12	15	19	12	15
	C45	NC	<i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	6	9	12	6	16
	C47	NC	<i>qnrB1</i> <i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	12	16	19	6	14
	C48	NC	<i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	12	19	23	6	15
	C53	NC	<i>qnrB1</i> <i>aac(6')-lb-cr</i>	BIEE	6	11	13	23	18

#### 4.3.5 Comparación de las poblaciones con PMQR.

Los determinantes PMQR (*qnrB* y *aac(6')-Ib-cr*) son los más prevalentes en las poblaciones de estudio, tal como era esperable. (Tabla 25).

Los alelos de *qnrB* encontrados presentan una frecuencia diferente en cada país al comparar, los aislamientos de enterobacterias RCTG. Se encontró que en Argentina predomina el alelo *qnrB2* con una frecuencia de 42,8 % (9 *qnrB2* / 21 *qnrB* totales), en Perú *qnrB19* con 71,4 % (5/7) y en Colombia *qnrB1* con 72,7 % (8/11). A diferencia de lo que sucede en los aislamientos de Argentina que presenta 5 alelos de diferentes *qnrB*, en Colombia y Perú se presentaron solamente dos variantes alélicas, *qnrB19*<sup>26</sup> y *qnrB1*.

En los microorganismos analizados de Perú y Colombia todos los amplicones obtenidos para la detección de genes tipo *aac(6')-Ib* resultaron ser la variante *aac(6')-Ib-cr*, a diferencia de lo encontrado en Argentina donde el gen *aac(6')-Ib* aparece en proporciones similares a la variante *aac(6')-Ib-cr*.

Es importante subrayar que al analizar los porcentajes de *oqxAB* se consideraron en forma separada los aislamientos de *K. pneumoniae* ya que en esta especie su localización suele ser cromosomal.

**Tabla 25: Resumen de los genes PMQR detectados en las poblaciones de estudio.**

País		PMQR N (%)					<i>K. pneumoniae</i>	
		<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>qep A</i>	<i>oqxAB</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>oqxAB*</i>	
Argentina	BLEE	21(36,8)	-	-	-	22(38,6)	22/23(95,6)	
Perú	BLEE	7(25,9)	1(3,7)	1(3,7)	3(11,1)	15(55,5)	8/11(72,7)	
Colombia	RCTG	11(52,4)	1	1	-	15(71,4)	12/14(92,3)	
	SCTG	1(3,1)	-	-	-	6(18,7)	2/3	

*oqxAB\**: número de aislamientos en los que se detectó *oqxAB* / número total de la población de *K. pneumoniae*, - :No detectado.

Los grupos filogenéticos de las *E. coli* que presentaron al menos un determinante PMQR se presentan en la Tabla 26, donde se observa que el grupo filogenético predominante es B2 en Argentina, Perú y en los aislamientos SCTG de Colombia, mientras en los RCTG de Colombia son más frecuentes los del grupo filogenético D.

Dentro de los aislamientos de *K. pneumoniae* (de Argentina y Perú), no se detectaron los genes de virulencia *magA* y *rpmA*; en los aislamientos de Colombia no se determinó este análisis

<sup>26</sup> Los alelos de Colombia son *qnrB19*like, el tamaño de la secuencia obtenida no permite diferenciarlo del alelo *qnrB5*

**Tabla 26: Grupos filogenéticos en *E. coli* con PMQR**

Grupos filogenéticos (N)					
País	Característica	A	B1	B2	D
Argentina	RCTG	2	2	5	2
Perú	RCTG	1	1	5	3
Colombia	RCTG	-	-	2	5
	SCTG	1	-	3	2

En la tabla se observan el número de aislamientos de *E. coli* que presentan al menos un PMQR, por cada grupo filogenético.

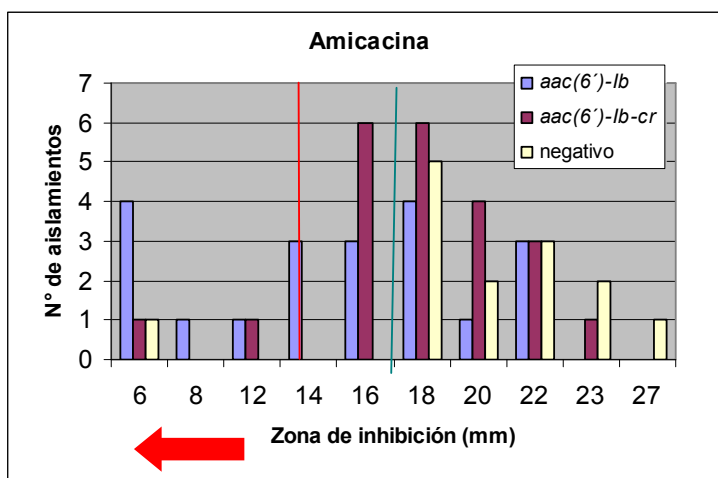
#### 4.4 Comportamiento fenotípico de *aac(6')-Ib-cr* en las poblaciones de estudio

##### 4.4.1 Aminoglicósidos

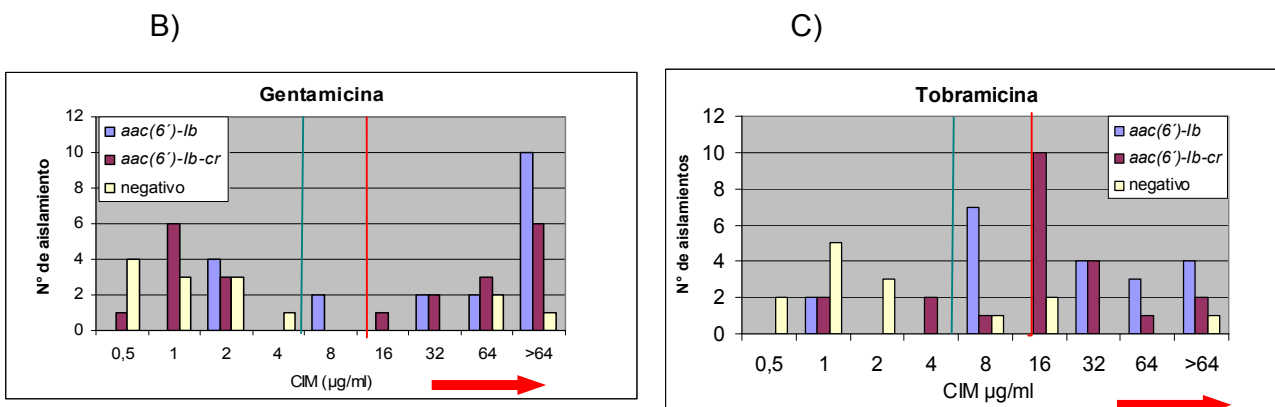
En el siguiente apartado se analiza el perfil fenotípico de cada grupo de aislamientos (en presencia o ausencia de enzimas de tipo *aac(6')-Ib*) frente a los aminoglicósidos probados. En Argentina (Figura 38), se observa que la mitad de los aislamientos (21/42) que presentan la enzima *aac(6')-Ib-cr* y *aac(6')-Ib* muestran halos de sensibilidad para AMK, por el contrario el 14,3 % (6/42) y el 28,6 % (12/42) de los aislamientos se categorizaron como sensibles por CIM para TOB y GEN respectivamente.

**Figura 38: Fenotipos de los aislamientos Argentinos ante AMK, GEN y TOB**

A)



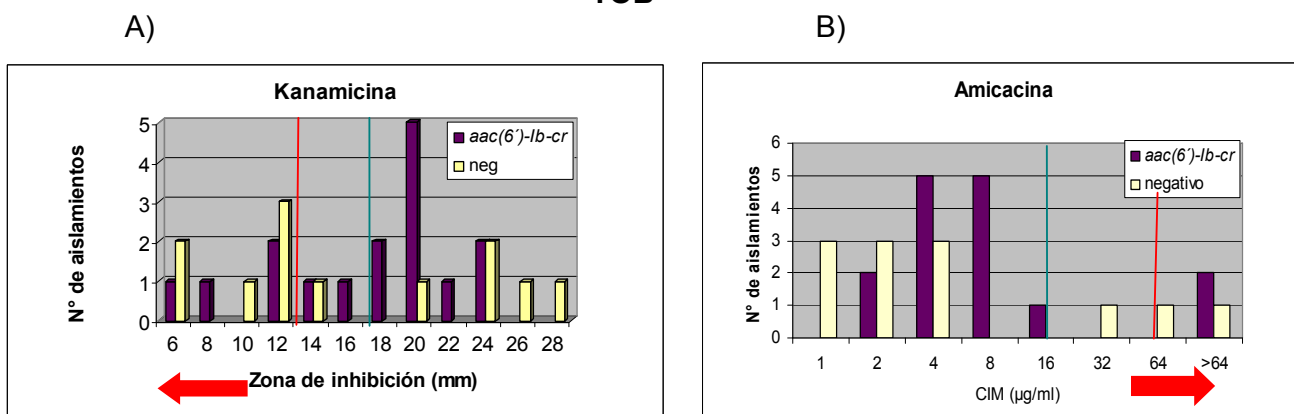


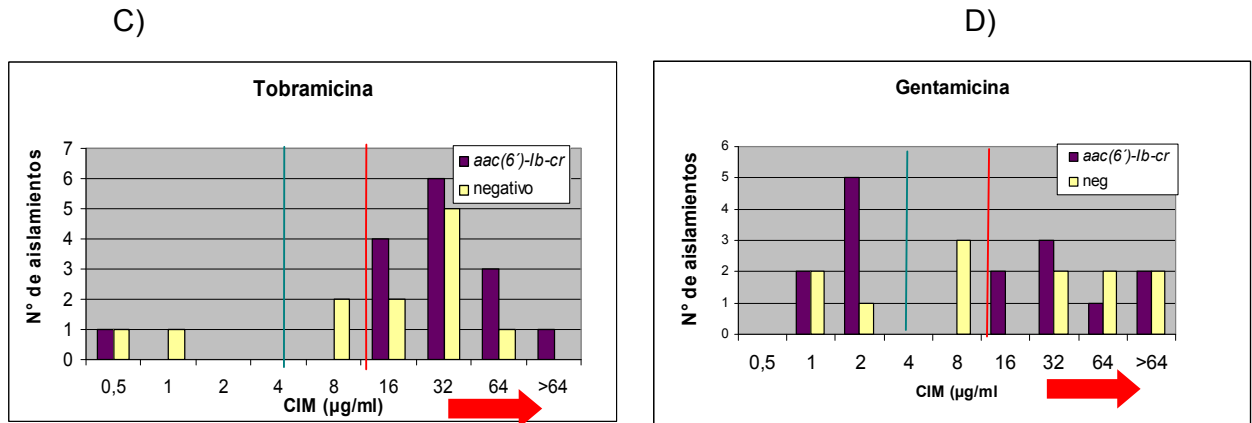


A) AMK, B) GEN, C) TOB: negativos: aislamientos en los que no se detectó *aac(6')-Ib*; *aac(6')-Ib-cr*: aislamientos en que se detectó la variante *aac(6')-Ib-cr*, aislamientos en los que se detectó *aac(6)-Ib* en cualquiera de sus variantes diferentes a *cr*. La línea verde indica el punto de corte según CLSI 2014, de los aislamientos sensibles, la línea roja indica el punto de corte de los aislamientos resistentes, lo que se encuentra entre las dos líneas son los aislamientos categorizado como intermedios, y la fecha roja indica la dirección de los aislamientos resistentes.

En los aislamientos de Perú se observó que gran parte de aquellos portadores de *aac(6')-Ib-cr* se encuentran categorizados como sensibles para AMK (13/15), KAN (10/15) y GEN (7/15). Sin embargo, al igual que en Argentina, TOB parece ser el mejor predictor de estas enzimas ya que solo 1/15 aislamiento *aac(6')-Ib-cr* positivo resulto sensible (Figura 39).

**Figura 39: Fenotipo de los aislamientos de Perú a AMK, GEN, KAN y TOB**

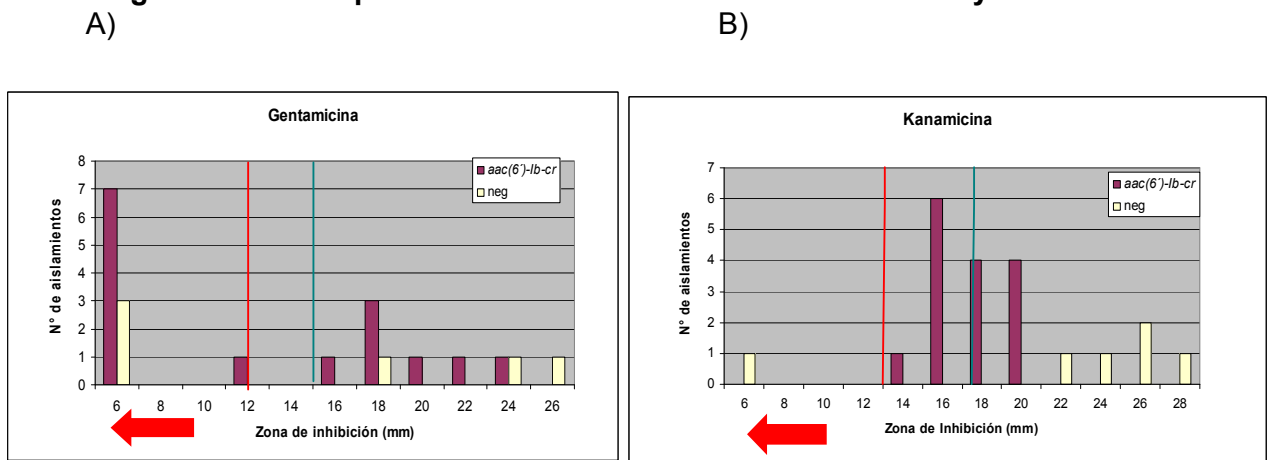


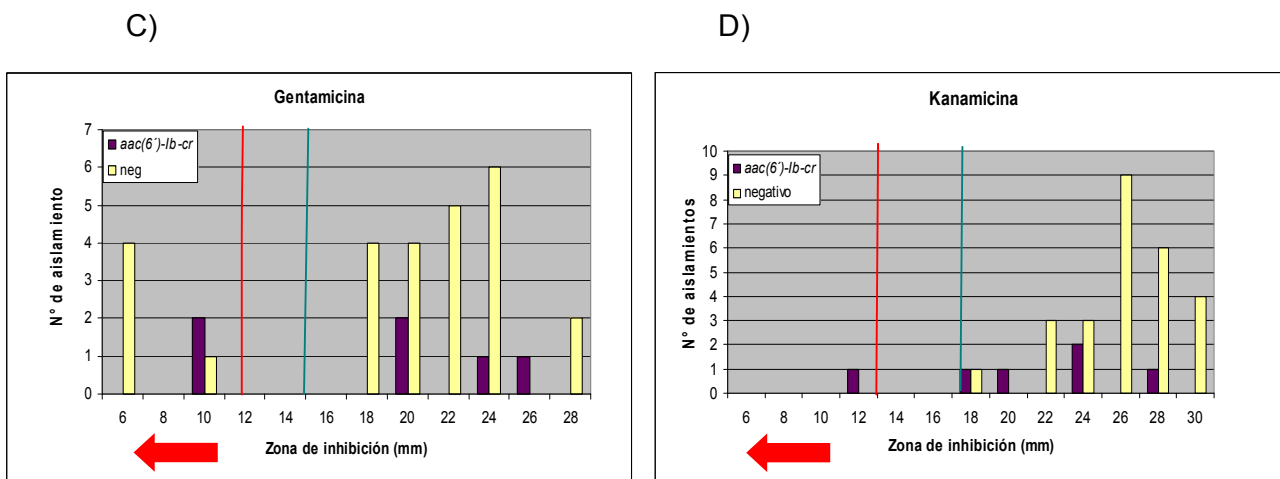


A) KAN B) AMK, C) TOB, D) GEN: negativo: aislamientos en los que no se detectó *aac(6')-Ib*; *aac(6')-Ib-cr*: aislamientos en que se detectó la variante *aac(6')-Ib-cr*, La línea verde indica el punto de corte según CLSI 2014, de los aislamientos sensibles, la línea roja indica el punto de corte de los aislamientos resistentes, lo que se encuentra entre las dos líneas son los aislamientos intermedios, la flecha roja indica la dirección de los aislamientos resistentes.

En los aislamientos de Colombia (tanto RCTG como SCTG) también se observa alta frecuencia de aislamientos *aac(6')-Ib-cr* positivos sensibles a KAN y GEN (Figura 40)

**Figura 40: Fenotipo de los aislamientos de Colombia a GEN y KAN**





A) y B) aislamientos RCTG; C) y D) aislamientos SCTG : negativo: aislamientos en los que no se detectó *aac(6')Ib*; *aac(6')Ib-cr*: aislamientos en que se detectó la variante *aac(6')-Ib-cr*, La línea verde indica el punto de corte según CLSI 2014, de los aislamientos sensibles, la línea roja indica el punto de corte de los aislamientos resistentes, lo que se encuentra entre las dos líneas son los aislamientos intermedios, la flecha roja indica la dirección de los aislamientos resistentes.

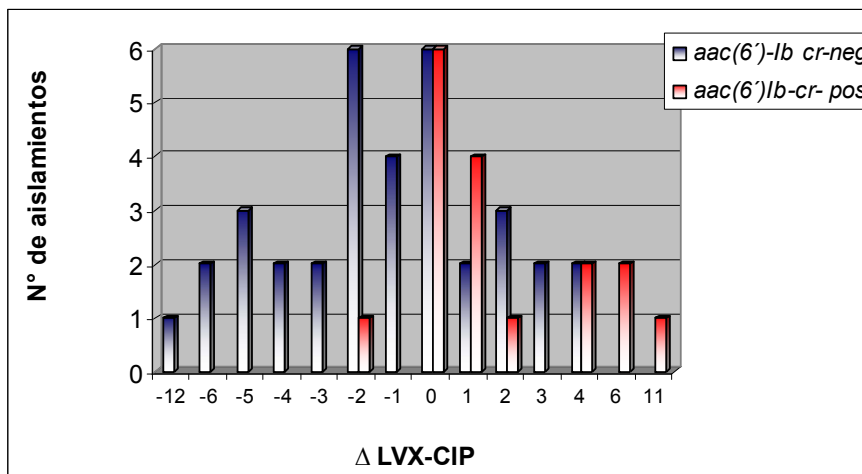
#### 4.4.2 Quinolonas y Fluoroquinolonas

El grupo de Andres *et al* (86), propone que una diferencia igual o mayor a 5 mm entre el halo de LVX y CIP podría indicar la presencia de la enzima *aac(6')-Ib-cr*.

En base a ello, se analizaron los datos del antibiograma en los aislamientos de Perú y Colombia, calculando las diferencias entre los halo de inhibición entre LVX y CIP ( $\Delta$  LVX-CIP).

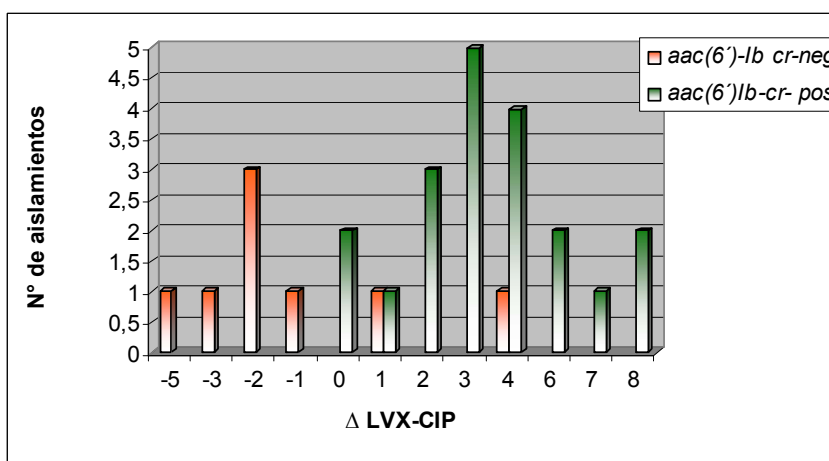
Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 27 y las diferencias observadas en los tamaños de los halos para *E. coli* y *K. pneumoniae* (*aac(6')-Ib-cr* positivas y negativas) se muestran en la Figura 41 y Figura 42 respectivamente

**Figura 41: Diferencia entre LVX-CIP en *E. coli***



En la gráfica se observa la dispersión de los datos ( $\Delta$  LVX-CIP) en los aislamientos de *E. coli* en los que se detectó el gen *aac(6')* *Ib-cr* en comparación a los que no los presentaron.

**Figura 42: Diferencia LVX- CIP en *K. pneumoniae***



En la gráfica se observa la dispersión de los datos ( $\Delta$  LVX-CIP) en los aislamientos de *K. pneumoniae*, que se detectó el gen *aac(6')* *Ib-cr* en comparación a los que no los presentaron.

Se observa que son muy pocos los aislamientos (< 25 %) que presentan esta enzima y a su vez cumplen con el criterio de mostrar una diferencia de halo igual o mayor de 5 mm. La gran mayoría de los aislamientos tanto de *E. coli* como de *K. pneumoniae* en las que se detectó esta enzima se encuentran por debajo de este rango.

**Tabla 27: Relación CIP y LVX de los aislamientos de estudio**

Especie	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Mediana (Rango)	>5mm/total aislamientos
<i>E. coli</i>	Positivo	9 (-2 a 11)	3/17
	Negativo	-1 (-12 a 4)	0/35
<i>K. pneumoniae</i>	Positivo	3 (0 a 8)	5/20
	Negativo	-2 (-5 a 4)	0/8

Adicionalmente, algunos de los aislamientos que no cuentan con este mecanismo muestran diferencias muy próximas al criterio propuesto (4 mm), dato que podría verse influenciado por el error de lectura propio de la técnica.

Los resultados fenotípicos de los aislamientos que presentaron una diferencia ( $\Delta$  LVX-CIP) mayor o igual a 5 mm, se observan en la Tabla 28, donde se observa que 3/17 *E. coli* y 5/20 *K. pneumoniae* presentaron esta diferencia, dentro de los aislamientos con *aac(6')-Ib-cr*.

**Tabla 28: Aislamientos con diferencia  $\Delta$  LVX-CIP mayor o igual a 5 mm**

Especie	aislamiento	antibiograma (mm)			PMQR
		NAL	CIP	LVX	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
<i>E. coli</i>	IMT1	6	6	12	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
	SB2	6	6	12	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
	ER1	6	6	17	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
<i>K. pneumoniae</i>	GA4	6	6	12	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
	DAC1	6	6	12	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
	C8	6	11	18	<i>qnrB19</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i>
	AS4	6	9	17	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
	C17	12	11	19	<i>qnrB19</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i>

#### 4.5 Caracterización de los aislamientos positivos para *qepA* y *oqxAB*

##### 4.5.1 El gen *QepA*

###### 4.5.1.1 Características de los aislamientos

Como lo mencionamos anteriormente se detectaron tres aislamientos portadores de *qepA*, todos de la especie *E. coli* las características de los aislamientos fueron las siguientes:

**B2** es un aislamiento de Argentina que fue recolectado como parte estudio prospectivo de prevalencia de BLEE en Argentina 2010, esta cepa no presentó un patrón de resistencia a CTG Tabla 31, Aun así se efectuó la detección de genes RQMP, por su alto nivel de resistencia a quinolonas. Este aislamiento proviene de un hospital de CABA, de una paciente ambulatoria, de sexo femenino, de 88 años, que consultó por infección urinaria.

**UR1:** también recuperado de un urocultivo, y que hacía parte de un estudio de relevamiento de resistencia a CTG y producción de carbapenemasas en la zona metropolitana de Lima, Perú en el 2011. La resistencia de este aislamiento a CTG, se asignó a la presencia del gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub>.

**C27:** Fue aislado de un catéter peritoneal en una paciente de 4 años, de sexo femenino de un hospital de Santander, Colombia. A este aislamiento se le confirmó en forma fenotípica y genotípica una BLEE (*bla*<sub>CTX-M-2</sub>) y la AmpC (del cluster CIT, con PCR positiva para CMY-2) este fue el último de los aislamientos detectados por ello, no se completaron todos sus datos la detección fenotípica de la presencia de BLEE y AmpC se observa en la Figura 43.

#### 4.5.1.2 Sensibilidad Antibiótica

La

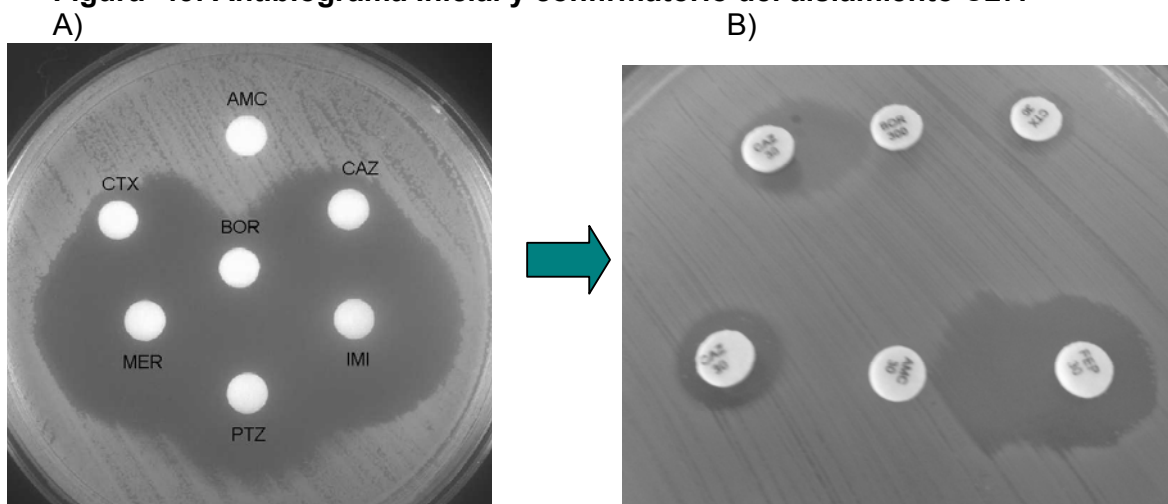
Tabla 29 muestra que el aislamiento C27 es sensible tanto a quinolonas, fluoroquinolonas, como a los aminoglicósidos probados, por otro lado de los dos aislamientos restantes que presentaron resistencia a las quinolonas y fluoroquinolonas B2 mostró resistencia a TOB, AMK y sensibilidad a GEN y UR1 fue resistente a GEN, y sensible a AMK y KAN.

**Tabla 29: Sensibilidad antibiótica a quinolonas y aminoglicósidos**

Cepa	CIM (µg/ml)							DD: ZI (mm)				
	NAL	CIP	LVX	GAT	AMK	TOB	GEN	NAL	CIP	LVX	GEN	KAN
B2	>512	>64	>64	>64	>64	>64	>64	6	6	ND	17	ND
UR1	>512	>64	64	64	1	32	>64	6	6	6	ND	23
C27	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	26	28	24	28	30

DD: Difusión de disco. ZI: Zona de inhibición, ND: No determinado

**Figura 43: Antibiograma Inicial y confirmatorio del aislamiento C27.**



A) El antibiograma inicial muestra la inhibición de las  $\beta$ -lactamasas por el ácido fenil borónico y una no muy clara inhibición por actividad del ácido clavulánico. B) E antibiograma confirmatorio muestra la presencia de AmpC por la inhibición con ácido fenil borónico y la presencia de BLEE por la inhibición con ácido clavulánico (usando como indicador FEP).

Los resultados de las pruebas fenotípicas y genotípicas de confirmación de la presencia de BLEE, en los tres aislamientos con *qepA* pueden observarse en la Tabla 30, donde dos de los tres aislamientos presentaron una BLEE de tipo CTX-M.

**Tabla 30: Resultados de la prueba confirmatoria de BLEE**

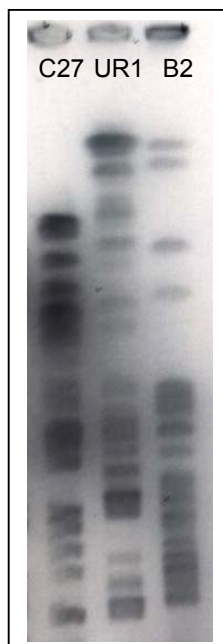
Cepa	BLEE	Prueba confirmatoria			
		CTX	CAZ	CTX CLA	CAZ CLA
B2	-	28	27	28	29
UR1	CTX-M-14	8	23	23	26
C27	CTX-M-2	6	10	17	15

En la tabla se puede observar los halos de inhibición que presentan los aislamientos a CTG con y sin ácido clavulánico, además del gen detectado responsable de este fenotipo.

#### 4.5.1.2 Tipificación y caracterización de la resistencia acompañante.

Las tres *E. coli* con el gen *qepA* pertenecen a grupos filogenéticos asociados a patogenia y dada su disimilitud de secuenciotipos o grupos filogenéticos (Tabla 31) no presentaron ninguna relación entre si por PFGE (Figura 44),

**Figura 44: PFGE de aislamientos con *qepA***



En la figura se observan los fragmentos de macro restricción por PFGE con *Xba*I, de los tres aislamientos con *qepA*.

B2 y UR1 presentaron niveles considerables de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas, siendo más notoria en B2 que mostró una mutación más que UR1 en las regiones QRDR, C27 en cambio pese a la presencia de la bomba de eflujo se mostró y ninguna de las mutaciones encontradas se encuentra dentro de la region QRDR Tabla 31.

En B2 y UR1 se detectó *bla*<sub>TEM-1</sub>, y *bla*<sub>OXA-1</sub> en B2. No se detectaron los genes *bla*<sub>OXA-2</sub>, ni *rmfB*<sup>27</sup> en ninguno de los dos aislamientos. Este cribaje no fue realizado en el aislamiento C27 ya que fue incorporado al final del trabajo.

**Tabla 31: Características de los aislamientos con *qepA***

Cepa	Grupo Filogenético	ST	BLEE	PMQR	QRDR	
					<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
B2	D	ST68	-	<i>qepA1</i> <i>qnrB10</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i>	S83L, D87N	S80I, E87G
UR1	D	ST405	CTX-M-14	<i>qepA1</i>	S83L, D87N	S80I
C27	B2	ND	CTX-M-2	<i>qepA*</i>	SC	SC

SC: sin cambios en la zona QRDR \* presentan cambios con los alelos nucleotídicos respecto a los alelos *qepA1* y *qepA2*

#### 4.5.1.3 Variantes alélicas de *qepA*

El alelo *qepA* amplificado a partir de C27, posee una concordancia del 99% con *qepA*, La proteína madura se diferencia de QepA1 por los cambios F95L y V134I y de QepA2 por F95L y G99A (Ver anexo IV), este alelo podría denominarse *qepA3* posterior a investigar su funcionalidad.

#### 4.5.1.4 Caracterización plasmídica

Los plásmidos originalmente encontrados en los aislamientos clínicos B2 y UR1 y de sus tranconjugantes y electroporantes, así como las características de los mismos se observan en las tablas (Tabla 32, Tabla 33) de C27 solo se logró determinar la presencia de al menos cuatro plásmidos de tamaños similares a 73, 98, 159 y 160.

<sup>27</sup> Gen correspondiente a una metilasa asociada a la presencia del gen *qepA*.



**Tabla 32: Características de Electroporantes y Conjugantes de los aislamientos B2**

Cepa	Tño plásmido	PBRT-Inc	PMQR	NAL	CIP	LVX	GAT	AMK	TOB	GEN
<b>B2</b>	~97 80 40	<i>FIB</i> , <i>F<sub>repB</sub></i> <i>N, 11</i>	<i>qnrB10</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>qepA</i>	>512	>64	>64	>64	4	32	1
<b>B2-A7</b>	~40	<i>N</i>	<i>qnrB10</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i>	2	0,0625	0,0625	0,0625	4	16	0,5
<b>B2-A10</b> <b>TOP10</b>	~97	<i>FIB</i> , <i>F<sub>repB</sub></i>	<i>qepA</i>	1	0,015	<0,031	<0,031	1	0,25	0,5
				1	<0,0019	<0,031	<0,031	0,5	0,25	<0,125
<b>B2-TC3</b> <b>J53</b> <b>AZI<sup>R</sup></b>	~80/40	<i>N, 11</i>	<i>qnrB10</i> <i>aac(6')Ib-cr</i>	8	1	0,25	<0,25	ND	8	<0,5
				4	<0,06	0,015	<0,25	ND	<0,5	<0,5

En rojo se encuentran las cepas receptoras, se marcan en amarillos los cambios con respecto a la *E. coli* Top10 y en naranja frente a la receptora *E. coli* J53 AZI<sup>R</sup>.

No se pudo transferir *qepA* por conjugación sin embargo, fue posible obtener un transconjugante de la cepa B2 quien conjugó con *E. coli* J53, transfiriendo dos plasmidos, los genes *qnrB10* y *aac(6')Ib-cr* fueron determinados en la cepa conjugante, Las características de la misma puede observarse en la Tabla 32.

**Tabla 33: Características de las electroporantes de UR1**

CEPA	Tño del plamido	PBRT	NAL	CIP	LVX	GAT	AMK	TOB	GEN
UR1	~90	<i>F<sub>repB</sub></i>	>512	>64	64	64	1	32	>64
UR1-CRO2	~90	<i>F<sub>repB</sub></i>	1	0,0078	<0,031	<0,031	1	2	16
<b>TOP10</b>			1	<0,0019	<0,031	<0,031	0,5	0,25	<0,125

En rojo se encuentran las cepas receptoras, se marcan en amarillos los cambios con respecto a la *E. coli* Top10.

Los plásmidos que contenían *qepA* fueron electroporados en *E. coli* Top 10, tanto para la cepa B2 como para UR1.

Se denominó B2-TC3 a la transconjugante procedente de la cepa B2, que presento dos plásmidos con los determinantes *qnrB10* y *aac(6')-Ib-cr*, las electroporantes de esta misma cepa se denominaron B2-A7 (que fue positiva para *qnrB10* y *aac(6')-Ib-cr*) y B2-A10 (*qepA1* positivo como único PMQR).

Para UR1, su electroporante se denominó UR1-CRO2 y fue positiva tanto para *bla<sub>CTX-M-14</sub>*, como para *qepA1*. Ambos electroporantes con *qepA1* fueron positivas por PCR para *bla<sub>TEM</sub>*.

El transconjugante B2-TC3 obtenido por conjugación, presento un incremento de la CIM en al menos 16 veces (4 diluciones) a CIP, LVX y TOB y en al menos 2 veces a NAL, siendo positivo para IncN, e IncI1. Posteriormente se logró obtener la electroporante con estos mismos genes, pero llevando un solo plásmido de alrededor de 40Kb, IncN En esta ocasión el incremento de la CIM se observó en todos los antibióticos probados presentándose un aumento de al menos dos veces con NAL, LVX, y GAT, al menos 32 veces a CIP, 8 veces a AMK, 64 veces a TOB y al menos 4 veces a GEN.

La electroporante obtenida a partir de B2 con el gen *qepA* presentó un plásmido de tamaño similar a 97Kb, IncFIB, IncF, que presentó cambios a nivel de la CIM aumentando al menos 7 veces frente a CIP, no presento cambios en NAL y en LVX y GAT no fueron detectados, Se han observado incrementos en las CIM a aminoglicósidos, con variaciones de al menos 2 veces a AMK y 4 veces a GEN, TOB no presento cambio.

El aislamiento de UR1 presentó un solo plásmido de alrededor de 90kb., positivo para IncF, *qepA* y *bla<sub>CTX-M</sub>*. El aislamiento de la electroporante mostró las mismas características que la donante, sugiriendo la presencia de estos dos genes en el mismo plásmido, la CIM para la electroporante mostró un incremento de al menos cuatro veces frente a CIP, dos veces para AMK, 8 veces para TOB y al menos 128 veces para GEN, el aislamiento vario susensibilidad a NAL y no se detectaron incrementos en LVX y GAT.

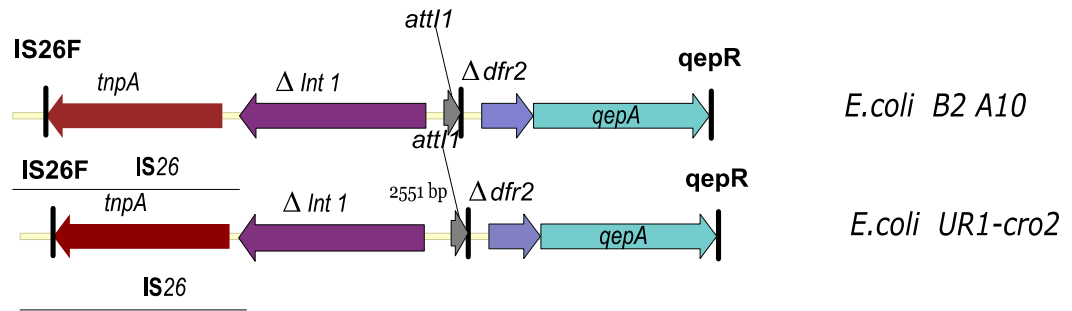
Los cambios en los valores de CIM entre aislamientos dadores y tranconjugantes o electroporantes se observan en la Tabla 32 y Tabla 33

#### 4.5.1.5 Caracterización del entorno de *qepA1*

Se logro amplificar fragmentos identicos de 2552 pb correspondiente a la secuencia la zona *upstream* de *qepA* en las electroporantes de B2 y UR1, tal comose muestra en Figura 45; Esta zona no amplifico en C27.

Los resultados iniciales, del mapeo de la zona *downstream* muestran que el entorno de C27 es totalmente diferente al de B2 y UR1 (datos no mostrados).

#### Figura 45: Contexto genético de los aislamientos B2 y UR1



Las flechas indican las secuencias codificantes y la dirección de la transcripción.  $\Delta dfr2$ : indica el gen *dfr2* incompleto, *attI1*: el sitio de reconocimiento de *intI1*  $\Delta intI1$ : gen deletado de la integrasa 1, *tnpA*: transposasa de *IS26*

#### 4.5.2 *OqxAB*

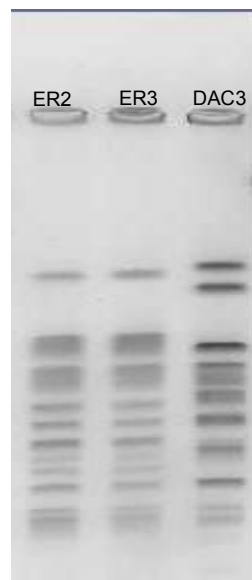
##### 4.5.2.1 Características de los aislamientos.

Los aislamientos positivos para *oqxAB* fueron recolectados en Lima, donde ER2 fue aislado de una punta de catéter, mientras que ER3 y DAC3 de urocultivos.

##### 4.5.2.2 Tipificación de los aislamientos.

DAC3 presentó patrones de digestión diferentes a los otros dos aislamientos como puede observarse en el PFGE (Figura 46) Recordemos que ER2 y ER3 presentaron los mismo patrones de bandas por rep-PCR lo que coincidió con el PFGE, sigiriendo una estrecha relación clonal, además de pertenecer al mismo secuenciotipo (Tabla 35) aunque parecen pertenecer a distintos grupo filogenéticos de estos dos aislamientos *aac(6')-Ib-cr* solo fue descrito sólo en ER3.

**Figura 46: Patrones obtenidos en el PFGE con *XbaI* de los aislamientos con *oqxAB* positivos.**



La figura muestra el perfil de bandas obtenido en los aislamientos ER2, ER3 y DAC3.

Los tres aislamientos presentaron *bla*<sub>CTX-M-65</sub> y fueron resistentes a NAL, CIP, GAT y LVX, a aminoglicósidos como GEN y TOB (Tabla 34) y a otros antibióticos como CL, los tres resultaron sensibles a AMK y solo DAC3 fue sensible a TET. Los tres mostraron las mismas mutaciones en las zonas QRDR de GyrA (S83L, D87N) y ParC (S80I) (Tabla 23).

**Tabla 34: Sensibilidad antibiótica a quinolonas y aminoglicósidos**

Cepa	CIM (µg/ml)							antibiograma: ZI (mm)			
	NAL	CIP	LVX	GAT	AMK	TOB	GEN	NAL	CIP	LVX	KAN
ER2	>512	32	32	64	4	32	16	6	6	6	26
ER3	>512	32	32	32	8	32	16	6	6	7	24
DAC3	>512	32	32	32	2	16	16	6	6	6	28

En la tabla se muestra los resultados por CIM y antibiograma a las quinolonas, fluoroquinolonas y aminoglicósidos probados, Los resultados en azul indican los aislamientos sensibilidad según CLSI 2012.

**Tabla 35: Características de los aislamientos que presentaron *oqxAB***

Cepa	Grupo Filogenético	ST	BLEE	RQMP	QRDR	
					GyrA	ParC
ER2	B1	ST602	<i>bla</i> <sub>CTX-M-65</sub>	<i>oqxAB</i>	S83L, D87N	S80I
ER3	D	ST602	<i>bla</i> <sub>CTX-M-65</sub>	<i>oqxAB</i> <i>aa(6')-Ib-cr</i>	S83L, D87N	S80I
DAC3	B1	ST448	<i>bla</i> <sub>CTX-M-65</sub>	<i>oqxAB</i>	S83L, D87N	S80I

#### 4.5.2.3 Caracterización de los plásmidos

Los resultados obtenidos con S1- nucleasa-PFGE, mostraron que ER2 y ER3 tenían al menos un plásmido de aproximadamente 100 Kb, mientras que DAC3 presentó al menos dos, uno de aproximadamente 100 Kb y otro de 90 Kb. (Tabla 35), Al electroporar los plásmidos extraídos se consiguió transferir en todos los casos el fenotipo de resistencia a C3G asociado a plásmidos de 100 Kb, Por el contrario solo se transfirió y en forma separada en dos de los tres aislamientos el plásmido con *oqxAB* en plásmidos de 100 Kb. El tercer plásmido de DAC3 de 90 Kb fue determinado por *Southern blot* posterior a S1 nucleasa –PFGE, determinado con sonda específica para *oqxB*.

Las electroporantes portadoras de *bla*<sub>CTX-M-65</sub> se denominaron ER2-CRO1, ER3-CRO1 y DAC3-CL5, mientras que aquellas con *oqxAB* se denominaron ER2-TRC1 y ER3-TCL4.

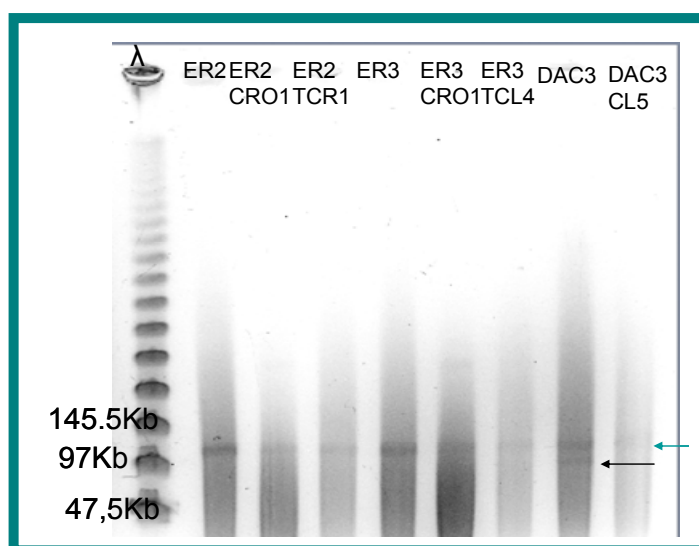
Todos los plásmidos portadores de *bla*<sub>CTX-M-65</sub> correspondieron a un único grupo de incompatibilidad, mientras que el plásmido *oqxAB* positivo contiene al menos dos replicones. Estos resultados se compilan en la Tabla 36 y se muestran en la Figura 47.

**Tabla 36: Caracterización de los plásmidos de los aislamientos y electroporantes de OqxAB**

A)		B)	
Grupos Incompatibilidad (PBRT)		Número de plasmidos / Tamaño (gen)	
ER2	<i>I1, FIB, K, F<sub>repB</sub></i>	ER2	uno / ~ 100Kb, ( <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ) uno / ~ 100Kb, ( <i>oqxA, oqxB</i> )
ER3	<i>I1, N, FIB, K, F<sub>repB</sub></i>	ER3	uno / ~ 100Kb, ( <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ) uno / ~ 100Kb, ( <i>oqxA, oqxB</i> )
DAC3	<i>I1, FIB, K, F<sub>repB</sub></i>	DAC3	uno / ~ 100Kb, ( <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ) uno / ~ 90Kb ( <i>oqxA, oqxB</i> *)
ER2-CRO1	<i>I1</i>		
ER3-CRO1	<i>I1</i>		
DAC3-CL5	<i>I1</i>		
ER2-TRC1	<i>F<sub>repB</sub>, FIB, K</i>		
ER3-TCL4	<i>F<sub>repB</sub>, FIB, K</i>		

A) En la tabla se observa el grupo (Inc/rep) determinado para los aislamientos clínicos, como para las electroporantes. B) En la tabla se observa el número y tamaño aproximado de los plásmidos de cada uno de los aislamientos.

**Figura 47: S1 Nucleasa -PFGE**



La figura muestra en orden de izquierda a derecha, Marcador de tamaño PFGE, ER2: aislamiento salvaje, ER2-CRO: electroporante con *bla*<sub>CTX-M-65</sub> de ER2,

ER2-TCR1: Electroporante de ER2 con OqxAB, ER3: aislamiento salvaje, ER3 CRO: electroporante con *bla*<sub>CTX-M-65</sub>, ER3-TCL4: Electroporante de ER3 con OqxAB, DAC3: aislamiento salvaje, DAC3-CL5: electroporante con *bla*<sub>CTX-M-65</sub>. Las flechas indican las posiciones de los plásmidos.

#### 4.5.3.4 Entorno genético de *oqxAB*.

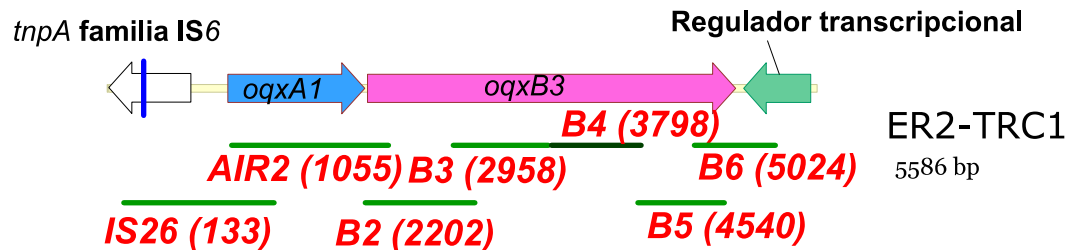
EL mapeo de los plásmidos correspondientes a los electroporantes ER2-TRC1 y ER3-TCL4 mostró que ambos poseen las variantes alélicas *oqxA1* y *oqxB3* (Figura 48) y una transposasa que presenta una similitud del 99% con *IS15DI*, Esta secuencia inserción forma parte de la familia IS6 donde también se encuentra IS26.

DAC3 no amplificó la región *upstream* a *oqxA*. El gen *oqxA* se secuenció casi en su totalidad, excepto un fragmento de 58 bp entre la posición 1448 y 1506, región que presenta las diferencias entre los alelos de *oqxA1* y *oqxA2*; (Figura 48). Por esta razón no se le asignó variante alélicas a *oqxA*, siendo la variante del transportador *oqxB3*.

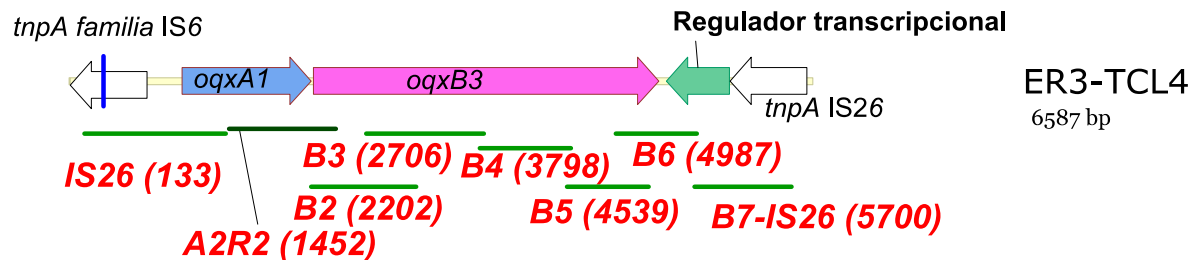
La región *downstream* preliminarmente encontrada mostro que al menos para ER3, la presencia del operon *oqxAB*, se encuentra entre transposasas de secuencias de inserción (Figura 48).

**Figura 48: Mapeo genético del aislamiento DAC3 las electroporantes *oqxAB* de ER2 y ER3**

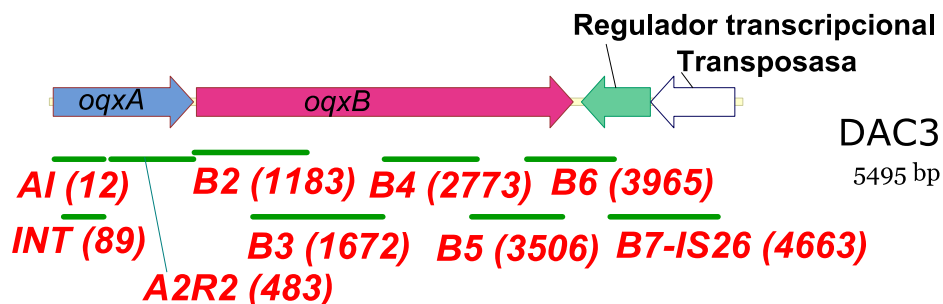
A)



B)



C)



La figura A muestra en entorno encontrado en la electroporante ER2-TRC1. Los primers utilizados se representan en rojo siendo IS26 (IS26F- *oqxA1*R), AIR2 (*oqxA1*F-*oqxAR*2), B2 (*oqxB2*Fy *oqxB1*R), B3 (*oqxB1*F y *oqxB3*R), B4 (*oqxB4* F y R), B5 (*oqxB5*F y R) y B6 (*oqxB6* F y R). La figura B. muestra en mapeo de la electroporante ER3-TCL4 se mantiene la disposición de primers utilizados para ER2-TRC1, adicionalmente se uso A2R2(*oqxA2*Fy R) y B7-IS26 (*qepAB7*F y IS26R) y la figura C muestra el mapeo en el aislamiento clínico DAC3 los primers se utilizaron así: AI (*oqxA1*F- *oqxAR*), INT (*oqxAF*, *oqxAR*) es resto de primers se manejaron igual que lo descrito anteriormente, las secuencias de los mismos se encuentran en la Tabla 16. Las flechas indican la dirección del gen, las líneas verdes inferiores las secuencias obtenidas con cada par de primers, en el paréntesis se muestra la posición de inicio de la secuencia. La línea azul indica los cambios de la transposasa (*tnpA*), al ser comparada con la secuencia del plásmido pOLA52 (GenBank.EU370913)

# Discusión de Resultados

---





## 5.0 Discusión de Resultados.

### 5.1 Sensibilidad antibiótica

Después de 24 años de la descripción del primer determinante del tipo PMQR, son muchos los estudios realizados, y dentro de ellos se ha reportado una asociación entre la presencia BLEE y la resistencia a fluoroquinolonas en enterobacterias (87). Este fenómeno es preocupante ya que se reducen las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones ocasionadas por estos microorganismos.

Es posible que la transferencia horizontal de plásmidos, o la presencia de diferentes elementos de movilización puedan promover e incrementar la co-resistencia de al menos estos dos grupos de antibióticos (47, 50, 108).

Sin embargo, hasta el momento de esta tesis no se habían realizado estudios en Latinoamérica que nos permitan conocer la prevalencia de estos genes y sus co-resistencias, permitiendo un mejor entendimiento de los mismos que conlleve a un uso adecuado de los antibióticos.

Este trabajo de investigación se realizó con cuatro poblaciones diferentes, de las cuales tres tenían en común la RCTG, y fueron recolectadas de tres países diferentes (Argentina, Perú y Colombia) y una cuarta población de Colombia con sus aislamientos SCTG.

Se observó que en estos tres grupos RCTG, además de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos, presentaron altos niveles de resistencia a quinolonas, fluoroquinolonas y aminoglicósidos. Los tres grupos presentan un nivel de sensibilidad a NAL entre 7 y 14 %, siendo los aislamientos de Argentina los que mostraron un menor número de aislamientos sensibles.

El grupo de aislamientos de Colombia presentó un mayor porcentaje de sensibilidad a CIP (22 %) y a LVX (65,2 %) que los aislamientos de Perú y Argentina. Esto puede deberse en parte, a las políticas de uso de estos antibióticos en cada región.

Estudios anteriores llevados a cabo en diferentes partes del mundo, (Norte de China, Sur África, Europa y en los países que participan en el estudio de monitoreo de tendencia de la resistencia bacteriana, SMART), han reportado una mayor resistencia a CIP que a LVX en *Enterobacteriaceae* (88-92). Estos resultados son similares a los que encontramos en las tres poblaciones de estudio, RCTG, sin embargo, en la población SCTG el nivel de sensibilidad es la misma para para ambas fluoroquinolonas.

En general, alcanza una única mutación de *gyrA* para provocar una alto nivel de resistencia en NAL y una disminución en la sensibilidad a las fluoroquinolonas (93). La acumulación de mutaciones en la zona QRDR de las topoisomerasas aumentan el nivel de CIM de estas últimas drogas (7). El perfil de resistencia presentado por los aislamientos de Colombia, en este estudio (mayor sensibilidad quinolonas y fluoroquinolonas), podría sugerir la presencia de un menor número de mutaciones a nivel

cromosomal. Lamentablemente, estos datos no llegaron a ser analizados en el presente trabajo.

La resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas no solo depende de las mutaciones a nivel cromosomal (94), sino de mezclas de mecanismos, ya sea plasmídicos, cromosomales o ambos, ya que muchos de los determinantes plasmídicos, solo disminuyen la sensibilidad a estos medicamentos y pueden ser encontrados tanto en aislamientos sensibles como resistentes a quinolonas (95).

El estudio de Villalobos *et al* (96) realizado en Colombia mostró una tendencia positiva en el incremento de la proporción de aislamientos con resistencia simultánea a cefotaxima y a ciprofloxacina, principalmente en *K. pneumoniae*. Se proponía, que este incremento era debido a la circulación de cepas productoras de BLEE, con mecanismos de resistencia a quinolonas cromosomales, (por mutaciones cromosomales en QRDR o alteraciones en las membranas externas y sistemas de expulsión)

Los aminoglicósidos son un grupo importante de antibióticos, que aunque mas tóxicos que los  $\beta$ -lactámicos y las fluoroquinolonas, son una alternativa importante en el tratamiento de las infecciones sistémicas y son utilizados en combinación con los  $\beta$ -lactámicos o glicopéptidos para conseguir una actividad bactericida (24).

Entre ellos, la TOB presento menores niveles de sensibilidad en los microorganismos analizados de Perú y Argentina. La AMK conservo entre el 60 al 80 % de sensibilidad, lo que considerando el sesgo de resistencia impuesto por la población de microorganismos estudiados no sería despreciable, muchos de estos aislamientos presentaron el gen *aac(6')-Ib-cr*, por lo cual se esperaría un mayor nivel de resistencia a AMK. Sin embargo no hay que olvidar que la presencia de mecanismos de tipo enzimáticos, es dependiente de la expresión de la enzima, además la variante *aac(6')Ib-cr* presenta una disminución de la eficiencia catalítica dentro de los aminoglicósidos, que se presenta cuando esta adquiere la capacidad de modificar fluoroquinolonas como CIP y norfloxacina (24, 55). Nuestros resultados sugieren que el mejor marcador de presencia de esta enzima es TOB.

La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) sugiere que en presencia de aislamientos sensibles a AMK y GEN pero que presenten una sensibilidad intermedia o resistente a TOB deben interpretarse como sensibilidad intermedia a AMK ya que puede tratarse de la presencia de la enzima AAC(6')- (24).

El grupo de vigilancia de la resistencia antimicrobiana en Europa (EARSS-NET), en su reporte del 2013, muestran una tendencia al incremento en la resistencia antibiótica por parte de los bacilos gram negativos, donde *K. pneumoniae* y *E. coli* mostraron incrementos en la resistencia, en al menos uno de los grupos de antibióticos que se encuentran bajo vigilancia y donde muchos de ellos presentaron una resistencia combinada a

cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y aminoglicósidos (14).

Datos de la PAHO (*Pan American Health Organization*) del año 2010 reportan para Latinoamérica, en *E. coli* de la comunidad, niveles de resistencia a CIP entre 12 al 80 % , donde los más altos niveles los presentaba Perú y los mas bajos Argentina (97).

Por otro lado, las investigaciones realizadas en enterobacterias comensales (*E. coli*) en niños de 2 a 12 meses de edad, de Perú, muestran elevados niveles de resistencia a quinolonas (32 % a NAL y 12 % a CIP), y se cree que estos niveles no son por presión antibiótica, si no por exposición a medicamentos antimaláricos o debido a la colonización intestinal de bacterias resistentes, que pueden ingresar a través del agua y alimentos (29)

Otros de los estudios realizados en microbiota comensal en niños de 6 a 72 meses del área urbana de Lima, presentaron niveles de resistencia de 62 % a NAL y 39 % a CIP. En estudios llevados a cabo en la amazonia peruana por el mismo grupo de investigación no detectaron niveles de resistencia a quinolonas en el año 2002 e inesperadamente, para el año 2009 se encontró un 45 % de resistencia a NAL y 12 % a CIP en *E. coli*, mostrando un incremento de resistencia en la microbiota comensal (29)

Es importante considerar la vigilancia de la (multi)resistencia para evaluar las intervenciones antimicrobianas de cada institución y la posibilidad de prevenir fallas terapéuticas (96, 98).

Los métodos utilizados (CIM-antibiograma por difusión) para medir la sensibilidad de los aislamientos, general mostraron buena concordancia.

Es interesante destacar que el antibiograma por difusión sigue siendo de gran ayuda para la detección de muchos de los mecanismos de resistencia a  $\beta$ -lactámicos, ya que pueden sugerir qué tipo de mecanismos están presentes cuando los discos son colocados con una disposición estratégica. No así, sucede con los aminoglicósidos, las quinolonas y las fluorquinolonas, donde se hace más difícil determinar y relacionar los posibles mecanismos con marcadores fenotípicos claros.

## 5.2 Características de la Población de Estudio

Se analizaron las características generales de las poblaciones en estudio, donde se realizó los grupos filogenéticos para las *E. coli* y se evaluó por rep-PCR la presencia de aislamientos relacionados clonalmente tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*.

En los tres grupos RCTG, los aislamientos de Argentina, de Colombia y de Perú concentraron el mayor número de aislamientos de *E. coli* en los grupos filogenéticos B2 y D. Estos grupos suelen concentrar mayor un número de factores de virulencia, mientras que A y B1 son considerados comensales con un menor número de genes de virulencia (122).

Del mismo modo, la mayor proporción de los aislamientos SCTG de Colombia se caracterizó como del grupo D.

En los aislamientos en los que se detectó PMQR, el grupo filogenético B2, fue el más frecuente tanto en Perú como en Argentina y en los aislamientos sensibles a SCTG, mientras en el caso de Colombia el grupo filogenético prevalente siguió siendo el D seguido de B2 con cerca de la mitad de la proporción inicial.

Todos los grupos filogenéticos de *E. coli* tienen la capacidad de adquirir y mantener diferentes determinantes de resistencia. Los filogrupos como B2 y D pueden tener una mayor presencia por que se conoce que en ellos se encuentran clones exitosos con capacidad de colonizar, propagarse, adaptarse a diferentes hospederos (123, 124) .

Los aislamientos de Argentina pertenecientes al grupo filogenético B2, presentaron perfiles similares por rep-PCR y fueron caracterizados como ST131, el cual corresponde a un clon pandémico conocido como “exitoso” en todo el mundo causante de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad (99). El ST131 es un clon reconocido por la resistencia que presenta a cefalosporinas especialmente por portar el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y su resistencia a fluoroquinolonas (99).

Los resultados de ERIC y REP en las poblaciones de Argentina y Perú, así como los grupos filogenéticos permiten apreciar una heterogeneidad clonal en la población. En los aislamientos de Argentina se presentaron dos *E. coli* (SM7 y SM8) con el mismo patrón de bandas, y diferentes determinantes del tipo PMQR donde SM7 presenta un gen adicional (*aac(6')-Ib-cr*) en comparación a SM8. Lo mismo sucedió con los aislamientos de Perú (ER2 y ER3), lo que nos hace pensar que en cada caso, son el mismo clon pero que uno de ellos adquirió o perdió posiblemente un elemento móvil que introdujo este gen.

Por otra parte, las bacterias del género *Klebsiella* continúan siendo importantes como patógenos oportunistas, asociadas a infecciones severas adquiridas en el ambiente hospitalario, tales como septicemias, neumonías, infecciones urinarias y recientemente abscesos hepáticos (asociados al clon ST23) (100). Se ha visto que tanto *K. pneumoniae* como *K. oxytoca* presentan un alto grado de heterogeneidad genética (101).

Las *K. pneumoniae* analizadas de Perú y Argentina, presentaron heterogeneidad clonal, pero los patrones de amplificación en algunas de ellas son bastante similares, marcando una posible proximidad clonal.

En el grupo de Argentina 7 de 8 *K. pneumoniae* fueron tipificadas como ST11 y se aprecia un clon prevalente por rep-PCR, denominado Kp1. Los aislamientos de *K. pneumoniae* ST11 se han descrito como clones endémicos en diversas regiones, uno de los casos se reportó en Hungría en el año 2003 (el primer informe del mismo), reportando la aparición de un clon epidémico de *K. pneumoniae* ST11 productor de CTX-M y resistente a CIP (102). El ST11 se considera un clon pandémico multiresistente exitoso que puede llevar diferentes genes de resistencia como NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, *aac(6')-Ib-cr* y *qnrB*, entre otros (103).

En los aislamientos de *K. pneumoniae* de Perú y Argentina, se investigó la presencia de los genes *magA* y *rpmA*. Estos genes son marcadores de virulencia, asociadas a un fenotipo característico hipermucoso. Dicho fenotipo ha sido vinculado al serotipo K1 y ST23. En ninguno de los aislamientos estudiados se pudo detectar la presencia de éstos genes, lo cual correspondió con el fenotipo observado (ausencia de hipermucoviscosidad). En Perú no se han reportado cepas con estas características. Sin embargo, en Argentina se cuenta con dos reportes de este tipo de aislamientos, siendo uno de ellos productor de la carbapenemasa KPC-2 (72, 104).

### 5.3 Mutaciones QRDR en los aislamientos de Perú.

En el grupo de aislamientos de Perú se determinaron las mutaciones cromosomales en los genes *gyrA* y *parC*, donde todas las *E. coli* presentaron dos mutaciones en GyrA (S83L y D87N) y una mutación en ParC en el codón S80I; tres aislamientos mostraron una segunda mutación en ParC (dos E84V y una A108V). Estas mutaciones ya han sido reportadas como responsables de generar resistencia a quinolonas y fluorquinolonas en *E. coli* y en otras especies bacterianas (38, 105-107)

La mayoría de las mutaciones encontradas en nuestros aislamientos coinciden con las mutaciones más comúnmente reportadas (codón 83 y 87 de GyrA y en el codón 80 y 84 de ParC) (38).

En la especie *K. pneumoniae*, la mayor parte de los cambios presentados en GyrA se dieron en los codones 83 y 87. Cuatro aislamientos mostraron S83F y D87A, dos aislamientos solo el cambio S83I y tres *K. pneumoniae* no presentaron cambios, mostrando niveles menores de CIM que aquellas que si presentaron mutaciones. Dos aislamientos (GA4y 155) mostraron una tercera mutación en el codón 154, Al igual que en *E. coli* los cambios comúnmente reportados en *K. pneumoniae* se dan en los codones S83, D87 de GyrA y en S80 y E84 de ParC (108). Se conoce que las mutaciones en QRDR son las causantes de los altos niveles de resistencia a quinolona y fluoroquinolonas tanto en *E. coli* como en otras especies bacterianas (109)

Los aislamientos de este estudio presentaron mayor sensibilidad a CIP que a LVX, donde la mayor proporción de aislamientos presentaron los cambios S83L, D87N; estudios previos reportan resultados similares en enterobacterias (90, 92, 110, 111) y Fu *et al* (88) reporta que las mutaciones en GyrA en las posiciones S83L y D87N pueden generar una resistencia mayor en CIP que en LVX.

Es notoria la diferencia en los valores de CIM de los aislamientos que poseen las mutaciones en las regiones QRDR en comparación a los que no presentaron cambios en dichas zonas, los cuales se categorizan como sensibles a las quinolonas y fluoroquinolonas probadas, según los puntos de corte del CLSI 2012(74).

El estudio de Deguchi *et al* (112) afirma que la acumulación de mutaciones en GyrA y la simultánea presencia de mutaciones en ParC tienen un papel primordial en los altos niveles de resistencia a quinolonas afectando también a las fluoroquinolona. Estos cambios se han observado en aislamientos productores de BLEE que presentan co-resistencia a fluoroquinolonas (113).

Se ha descrito una correlación entre el número de mutaciones y el nivel de resistencia donde tres mutaciones (dos en GyrA y 1 en ParC) se correlaciona a una CIM a CIP entre 8 y 32 mg/L (114). Esta premisa no se cumple en todos los aislamientos analizados ya que algunos presentan niveles mayores a 64 mg/L; esto puede deberse a la presencia de mecanismos acompañantes.

Adicionalmente, dos aislamientos (176 y AS2) que presentaron solo dos mutaciones (una en GyrA y una en ParC), presentan niveles de CIP de 16 y >32 mg/L, respectivamente. En estos dos últimos aislamientos también están presentes genes de tipo PMQR (*aac(6')-Ib-cr*), con influencia sobre CIP lo que puede ser la razón de una mayor CIM a CIP. Esta correlación tampoco se cumplió con los resultados presentados por Nam *et al* (37).

El cambio detectado en el aislamiento de *P. vulgaris* en GyrA en posición 83 fue también destacado en la investigación de Zhao *et al* (65), ParC no pudo ser amplificado; por lo tanto se deberían utilizar *primers* específicos para esta especie, así como también para la de *Serratia* sp.

Algunos de los cambios presentados en GyrA, se ubicaron fuera de la región QRDR que se encuentra comprendida entre el aminoácido 67 al 122, se desconoce el papel de estas mutaciones en los niveles de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas, y han sido encontrados en aislamientos tanto sensibles, como resistentes a CIP (115).

#### 5.4 Determinantes PMQR.

La frecuencia de aparición de genes PMQR en los aislamientos RCTG en los tres países fue mayor del 60 % donde la mayor proporción la mostró Perú con un 85,2 %, seguida de Colombia con 81 % y finalmente Argentina en un 67 %. Cabe destacar que se detectaron estos determinantes en dos de los aislamientos de Colombia productores de AmpC, mientras que no fue detectados en los aislamientos de este tipo pertenecientes a Argentina.

La frecuencia mostrada en los aislamientos SCTG de Colombia fue menor (28,1 %) que la presentada en los aislamientos RCTG.

Los determinantes PMQR detectados presentan una amplia distribución, presentando diferencias según el tipo de población analizada y su país de origen. Por ello, es necesario realizar los estudios de prevalencia de estos determinantes en cada país ya que los datos son particulares en cada región.

Uno de los aspectos a destacar, es que los niveles de CIM son mayores en los aislamientos que poseen al menos un determinante del tipo PMQR tanto en presencia como en ausencia de mutaciones cromosomales.

Se sabe que los genes PMQR reducen la sensibilidad a fluoroquinolonas y aumentan la CPM (concentración preventiva de mutantes). Este aumento permite la selección de mutaciones en los genes de las topoisomerasas, que son las responsables de los altos niveles de resistencia (114). El estudio de Jacobsen *et al* (116), realizado en murinos, como modelo de infección urinaria, demuestra que los aislamientos con estos determinantes reducen la capacidad bactericida de la CIP.

Los determinantes PMQR ya han sido descritos en diferentes especies y son considerados como uno de los más importantes mecanismos que direccionan la velocidad de propagación de los marcadores de multiresistencia (117).

Uno de los aspectos preocupantes es la relación que existe entre la presencia de las BLEE o las AmpC y los determinantes PMQR (22). Varios estudios de vigilancia sugieren una relación entre la presencia de *qnrB* y las BLEE (9, 118) o entre *aac(6')-Ib-cr* y la producción de CTX-M-15 en particular.(119).

La detección de un determinante tipo PMQR no es sencilla por métodos fenotípicos (antibiograma) o equipos automatizados (120, 121) y su detección molecular no siempre está disponible. Uno de los marcadores que podría sugerir su presencia es la sensibilidad disminuida a las fluoroquinolonas, siendo sensibles a ácido nalidíxico, situación que no suele ser de las más frecuentes (120, 121).

Será necesario evaluar puntos de corte en aislamientos sensibles que posean determinantes de tipo PMQR, e incluir en los sistemas automatizados para la determinación de CIM concentraciones de antibióticos que permitan detectar disminución de la sensibilidad en esta situación, se podrá alertar de un posible fracaso terapéutico teniendo en cuenta que la alteración en la CPM suelen estar en valores de CIM dentro de la categoría de sensible según los valores de corte clínicos vigentes (120, 121).

Hasta el momento, este parece ser el primer estudio que describe la frecuencia de determinantes de tipo PMQR en aislamientos RCTG, provenientes de Argentina, Perú y Colombia.

#### 5.4.1 Qnr

*qnrB* fue el determinante detectado con mayor prevalencia dentro del grupo de *qnr*. Los alelos predominantes de *qnrB* son diferentes en todos los países analizados siendo *qnrB2* el más frecuente en Argentina, *qnrB19* en Perú, y *qnrB1* en Colombia tanto en el grupo RCTG como en SCTG. En Argentina ya se habían descrito alelos de *qnrB* como *qnrB9-like* el cual no fue detectado en este estudio y *qnrB10* asociado con *aac(6')-Ib-cr*, el cual forma parte de un integrón complejo de clase 1 (122), En



nuestro estudio no se detectó *aac(6')Ib-cr* en los aislamientos portadores de *qnrB10*.

Por otra parte, en Perú se ha reportado una prevalencia de *qnrB* del 65% en 154 aislamientos de la microbiota comensal donde la mayor prevalencia la mostró el alelo *qnrB19* (123). Si bien los criterios de inclusión de los microorganismos analizados son diferentes, en este estudio se observa una menor proporción para *qnrB*. (25,9 %). Otro de los estudios realizados en Perú realiza la detección de genes de tipo PMQR en aislamientos de *E. coli* enteroagregativas en niños menores de 12 donde el único PMQR encontrado fue *qnrB19* en cinco de 139 aislamientos analizados (124).

En Colombia no se encuentran estudios epidemiológicos, pero se reportó un aislamiento *E. coli* portador de *qnrB19* asociado a un elemento de movilización similar a *ISEcp1* (125).

En este trabajo se obtuvo una distribución heterogénea de los diferentes alelos de *qnrB*, presentadas en diferentes especies y con diferentes tipos de BLEE principalmente relacionados con CTX-M del grupo 1 y 2.

Se hace necesario revisar periódicamente los nuevo alelos de todos los *qnr*, ya que son genéticamente heterogéneos (126) y se reportan cerca de 80 alelos para *qnrB*. Debido a esta diversidad, es posible que se necesiten más *primers* para su detección y así evitar subestimar la presencia de los mismos.

En esta investigación el gen *qnrS* se presentó en un aislamiento en el grupo de Perú; reportes de este gen se presenta en el estudio de prevalencia en la microbiota comensal, la prevalencia reportada por Pallechi *et al* (123) en 164 aislamientos de Perú, fue de 37 %. Este gen también fue reportado en Argentina (86) y Brazil (127).

Al igual que Perú, en la población analizada en este trabajo perteneciente a Colombia, se detectó un aislamiento portador de *qnrS*. Hasta el momento, no se encontraron reportes de este gen en Colombia por lo que sería el primer reporte de un aislamiento clínico *qnrS* positivo aislado en este país.

Sería interesante el estudio de los plásmidos *qnrS*, para entender su escasa diseminación, en general este gen se encuentra codificado en plásmidos pequeños que no traen genes de resistencia acompañante(7).

En Latinoamérica se presentan reportes de otros alelos de *qnr* que no fueron detectados en este estudio, como *qnrA1* que fue descrito en aislamientos recuperados en Colombia (128), Brazil (129) y Uruguay (130).

Recientemente, el gen *qnrD* fue encontrado en Argentina en un aislamientos clínicos de la tribu *Proteae* (131) y en Uruguay en una *Morganella morganii* siendo este el primer aislamiento portador de *bla*<sub>NDM-1</sub> y *qnrD* en Sur América (132).

Finalmente, y el único reporte de *qnrVC* en Latino america se realizó en Brazil en un aislamiento de *Vibrio cholerae* (133), este gen aun no se reportó en enterobacterias.

#### 5.4.2 Enzima modificadora de aminoglicósidos *Aac(6')-Ib-cr*.

La enzima modificadora de aminoglicósidos codificada por el gen *aac(6')-Ib* es la causa mas común de resistencia a los aminoglicósidos (134). Los aislamientos que producen esta clase de enzimas se caracterizan por ser resistentes a AMK, TOB y KAN (54) y ser sensible a GEN. La variante *Aac(6')-Ib-cr*, mantiene los mismos sustratos aunque actuando en forma menos eficiente pero adquiere la capacidad de acetilar CIP y NOR (55).

El gen *aac(6')-Ib-cr* se encuentra distribuido ampliamente alrededor del mundo (119, 122, 123, 135-137), ha sido reportado en plásmidos que pueden ser co-transferidos con otros genes de resistencia plasmídicos tales como *bla<sub>CTX-M</sub>* y *qnr* (138).

En este estudio, el gen *aac(6')-Ib-cr* fue el PMQR con mayor frecuencia de aparición, en los aislamientos analizados.

En Argentina, en el estudio llevado a cabo por Andres *et al* (86) encontró en un grupo de 75 aislamientos de fenotipo inusual a quinolonas, 17 aislamientos con el gen *aac(6')-Ib*, 9 aislamientos con la variable *aac(6')-Ib-cr*, y 15 aislamientos con ambos genes, donde en 5 aislamientos *aac(6')-Ib-cr* se encontraban como único gen PMQR mientras que 19 portaban además de un gen *qnr*, donde ninguna de las *E. coli* analizadas presentaron el gen *aac(6')-Ib-cr*.

Si bien no son comparables con los resultados de esta investigación (por el grupo de aislamientos estudiados), en ambos estudios se detectaron los genes *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr* y la presencia simultanea de ambos determinantes. En este trabajo, la variante *aac(6')-Ib-cr* se encontró en las especies de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y en *E. coli*.

Adicionalmente, este gen se encontró tanto como único PMQR, como acompañado de otros genes de resistencia a quinolonas mediado por plásmidos. Los estudios de Quiroga *et al* y Gomez S *et al* (122, 139) reportan la variante *aac(6')-Ib-cr* en un integron complejo clase 1 de aislamientos de Argentina. Es posible que el gen *aac(6')-Ib-cr* se encuentre como gen en casete, dentro de la región variable de un integrón de clase 1 (140)

La frecuencia de este determinante de resistencia reportado en aislamientos productores de BLEE es de 9,9 % en China (137), de 16,2 % en España, de 25,5 % en Francia (141), y de 37,6 % en Mexico (142). En este estudio en los aislamientos RCTG de Argentina presentaron una frecuencia de 38,6 % en el grupo de Perú de 55,5 % y de Colombia 71,4 %.

En general, en las distintos microorganismos analizados en este estudio, la presencia de la variante enzima modificadora de aminoglicósidos no parece tener relación con la presencia simultánea de *qnrB*. Este último

mecanismo se encontró presente en porcentajes similares en aislamientos con *aac(6')-lb-cr*, como en aquellos que no la tenían. La asociación de las BLEE (CTX-M del grupo 1) con *aac(6')-lb-cr* también fue observada en esta investigación, tanto en los aislamientos de Perú como los de Argentina. En esta última población, la asociación ocurrió específicamente con la enzima CTX-M-15 presentándose como la BLEE más prevalente en los aislamientos de Argentina (68).

En Perú se realizó el primer reporte de *aac(6')-lb-cr* en tres plásmidos de *E. coli* junto con CTX-M-15 que provenían de aislamientos comensales (123) y en Colombia se describieron tres *E. coli* con CTX-M-15 y la enzima *aac(6')-lb-cr* (143). Por los numerosos registros observados alrededor del mundo, esta fuerte asociación entre *aac(6')-lb-cr* y CTX-M-15 (144, 145), adquiere carácter de pandemia (146, 147).

CTX-M-15 se ha asociado además al clon ST131 de *E. coli*, un clon exitoso, altamente adaptado con una estructura genética que contiene tanto genes de virulencia como de resistencia, lo cual le ha permitido propagarse en todo el mundo como patógeno (148, 149).

El clon ST131 frecuentemente es resistente a fluoroquinolonas, probablemente debido a mecanismos cromosómicos potenciado por la presencia de PMQR de tipo *qnr* o *aac(6')-lb-cr* (148) tal como sucedió en cinco de los aislamientos de *E. coli* de Argentina, que presentaron el ST131 junto con *aac(6')-lb-cr* y *bla<sub>CTX-M-15</sub>* y forman parte del grupo filogenético B2.

El estudio de Mashana *et al* (150) destaca que los aislamientos con CTX-M-15 presentan un mayor nivel de resistencia a CIP, GEN, TMS y TET que los aislamientos con otros alelos de BLEE, pero que a su vez, los aislados productores de BLEE presentan una mayor co-resistencia a fluoroquinolonas, aminoglicósidos y tetraciclinas.

El comportamiento fenotípico de los aislamientos con la enzima AAC(6')-lb-cr no fue el esperado como lo mencionamos antes, observándose que el aminoglicósido que mostro sus características fue TOB (en Argentina y Perú), el comportamiento observado también podría ser explicado por la posible presencia de otra de las enzimas modificadoras de aminoglicósidos en un mismo aislamiento, que utilicen la GEN como sustrato, (119)

Sería necesario realizar estudios complementarios que nos permitan dilucidar la presencia de otras enzimas, así como estudios enzimáticos que permitan conocer el comportamiento de las mismas fuera de la célula además de secuenciarla en su totalidad en busca de nuevas variantes, que generen cambios en su comportamiento como parte de la evolución de las mismas (140).

Andres *et al* (86), proponen una técnica por difusión en disco, que podría mejorar la detección fenotípica de *aac(6')lb-cr* que aunque parece un muy buen acercamiento solo podría aplicarse en aislamientos en los que sólo se presenta este mecanismo.

Esta técnica se basa en que *aac(6')-Ib-cr* acetila CIP, sin modificar LVX, por lo tanto las diferencias en los halos igual o mayor de 5 mm (LVX-CIP), sería sugerente de la presencia de la enzima

Esta diferencia se probó en los aislamientos que tenían *aac(6')-Ib-cr* de Perú y Colombia, en donde la diferencia mayor a 5 mm solo se presentó en 8/37 aislamientos *aac(6')-Ib-cr* positivos, observándose un poder de detección (sensibilidad) < 25 % (aunque la especificidad haya sido del 100 %).

Se considera que esta técnica presenta una baja sensibilidad mediante antibiograma, y este hecho es seguramente debido a la interferencia de otros mecanismos que afectan adicionalmente a CIP y LVX.

## 5.5 Bombas de eflujo de tipo PMQR

### 5.5.1 QepA

El gen *qepA* codifica para una bomba de expulsión de tipo MFS, descrita inicialmente en un plásmido de *E. coli* en Japón (85) y posteriormente en Bélgica (151).

Esta bomba de eflujo confiere una disminución de la sensibilidad a fluoroquinolonas hidrofílicas como CIP y NOR (151) y ha sido detectada tanto en aislamientos clínicos, como en microbiota comensal de origen humano (3, 6, 113, 152) y animal (5, 153).

En nuestro estudio *qepA* fue detectado en baja frecuencia, donde se detectó en un aislamiento productor de BLEE de Colombia, en otro de Perú y en un aislamiento SCTG encontrado en Argentina que había quedado excluido del grupo analizado en el corte de prevalencia de resistencia a CTG.

El gen *qepA* han sido descrito en muy pocos aislamientos clínicos humanos de *E. coli* en el mundo y esta baja prevalencia ha sido mostrada en diferentes estudios, independientemente del criterio de selección empleado. Yamame *et al* (154) presentó en Japón una prevalencia de 0,3 % en una población de aislamientos recolectados entre el 2002 al 2006, aislamientos que hacen parte de una colección de *E. coli*. Un estudio multicéntrico en enterobacterias productoras de BLEE muestra una frecuencia ligeramente mayor de 1,7 % (142), En Argentina, los estudios recientes de vigilancia no reportan la presencia de este gen (131, 142).

En nuestro conocimiento B2 es el primer aislamiento clínico detectado en Argentina y el primero en Sur América, UR1 es el primero en Perú y C27 el primero en Colombia. Posteriormente, otro de los miembros de nuestro equipo de investigación detectó aislamientos de *E. coli* portadores de *qepA* en Bolivia, datos que fueron presentados en Washington en el *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (155). Bartoloni *et al* (6), describió esta bomba de eflujo en la región del Chaco Boliviano en el 2011, pero los aislamientos analizados provenían de hisopados rectales de una población de niños sanos.

Los tres aislamientos analizados en los que se detectó *qepA*, presentan características muy diferentes, ya que B2 no presenta BLEE, UR1 presenta BLEE y C27 presenta tanto BLEE como AmpC, siendo los dos primeras multirresistentes, con alta resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas; mientras que C27 es sensible a quinolonas, fluoroquinolonas, y aminoglicósidos probados.

Si comparamos los niveles de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas de estos aislamientos observamos que, como ya lo reporta la bibliografía, un mayor número de mutaciones presentes en GyrA y ParC confiere un mayor nivel de resistencia, teniendo en cuenta que los altos niveles de resistencia conseguidos son multifactoriales (156). De esta forma B2 que posee una mutación más y tiene dos mecanismos de tipo PMQR, presenta mayores niveles de resistencia que UR1, Mas aun C27 que no presenta cambios en las zonas QRDR, de GyrA o ParC, ni mecanismos adicionales, permanece sensible.

La coexistencia de más de un mecanismo PMQR junto a *qepA* solo se presentó en el aislamiento B2, lo que esto ya ha sido reportado en aislamientos de animales donde junto a *qepA* se ha reportado *aac(6')-Ib-cr* y *qnrS1* o *qnrS2* (5).

Es interesante que los aislamientos B2 y UR1 son aislamientos de *E. coli* urinaria y C27 fue aislado de un catéter peritoneal el cual es usado en pacientes pediátricos con insuficiencia renal. La mayoría de los estudios donde se ha encontrado *qepA* en aislamientos clínicos son detectados en muestras de origen urinario (52, 157) ; en forma menos frecuente se ha detectado en materia fecal (152).

Este mecanismo fue también hallado en aislamientos recuperados de muestras de bilis y esputo pero no en *E. coli*, sino en *Enterobacter aerogenes* (158).

Los aislamientos B2, UR1 y C27 pueden considerarse *E. coli* virulentas de origen extraintestinal, donde B2 y UR1 son del mismo grupo filogenético (D), pero corresponden a diferentes ST, Tal como sería esperable salvo en presencia de un clon epidémico, los tres aislamientos no se encuentran clonalmente relacionados.

Previamente *qepA* había sido encontrada en Sur America son *E. coli* de los filogrupos D y A, productoras de enzimas de tipo CTX-M (*bla*<sub>CTX-M-14</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub>), aislados de los niños del Chaco (6).

Los aislamientos detectados en Canadá (113) y en México (152) con *qepA* eran *E. coli* en las que se detectó *bla*<sub>CTX-M15</sub>, este tipo de asociación es preocupante, por que podría propagarse en ambientes comunitarios y hospitalarios, donde su co-selección por diferentes antimicrobianos podría contribuir a su diseminación (113).

En UR1 y C27 se encontraron genes *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (CTX-M del grupo 9) y *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (CTX-M del grupo 2), respectivamente. Tanto en humanos como en animales(5) los aislamientos productores de BLEE, en los que se han detectado el gen *qepA* junto a una enzima del tipo CTX-M, han sido

principalmente del grupo 1 y del grupo 9 (3, 5, 52, 113, 152, 153, 159), pero no se encontraron reportes con CTX-M del grupo 2.

Es interesante el número de plásmidos que posee C27 a pesar de ser bastante sensible, lo que sugiere un bajo número de genes de resistencia en estos plásmidos.

La secuencia nucleotídica del fragmento amplificado de *qepA* de B2 y UR1 es idéntica a la variante alélica 1 de este gen QepA1 (QepA2 descrito por primera vez en Francia, varían en dos aminoácidos (A99G y V134I) en comparación con QepA1)(52).

Por el contrario, la secuencia nucleotídica de *qepA* en el aislamiento C27 posee una concordancia del 99% con las *qepA* depositadas en base de datos. Los cambios aminoacídicos observados con QepA1 son F95L y V134I y con QepA2 los cambios se producen en F95L y G99A (anexo IV) pero presenta una similitud del 100%, con el encontrado en una *E. coli* aislada de aguas de desague en Portugal registrado en agosto del 2014 (número de acceso: GenBank K934677.1). Esta secuencia fue confirmada por doble secuenciación, lo que podría sugerir la presencia de un nuevo alelo.

Si bien, *qepA1* ha sido asociado físicamente ligado a *rmtB* (157) (un gen codificante para una metilasa del ARNr 16S que confiere pan-resistencia frente a los aminoglicósidos. En los tres aislamientos con *qepA* de este estudio este gen no fue detectado. Estos resultados podrían estar explicados al considerar la altísima tasa de portación del gen *rmtB* en China en aislamientos recuperados de animales, donde el 58,3 % de los aislamientos que poseen *rmtB* poseen a su vez *qepA* (160). Otros estudios muestran que *qepA1* no necesariamente se encuentra asociado a *rmtB* (158) *qepA2* no ha sido asociado con *rmtB* (52).

Los plásmidos de *qepA* en B2 y UR1 no pudieron ser transferidos por conjugación en nuestras condiciones. El plásmido BicA que posee el gen *qepA2*, es considerado un plásmido movilizable mas que conjugativo; por el contrario, los plásmidos portadores de *qepA* de otros estudios lograron ser transferidos por conjugación (52, 151, 152, 157).

El incremento en la CIM de los aislamientos en los que se electroporó *qepA* se encontró una variación de 4 a 7 veces para CIP, diferentes autores sugieren que el mecanismo QepA1 puede incrementar los niveles de CIM a CIP y NOR entre 4 y 36 veces (151, 152, 157, 160) Las variaciones probablemente son debidas a una expresión variable del mecanismo, lo cual puede depender de la fuerza del promotor y del microorganismo receptor. Xu *et al* 2012 (161) ha demostrado este fenómeno para el gen *qnrA*; sin embargo, son necesarios mas estudios para demostrar este comportamiento con *qepA*.

Las variaciones obtenidas en los valores de CIM en presencia de *qepA* no generan un cambio de categoría de sensible a resistente, aunque producen claramente una disminución en la sensibilidad (3), lo que permite que los aislamientos puedan permanecer en la ventana de

selección de mutantes y conlleva a cambios en la CPM que podría generar problemas terapéuticos.

Se ha comprobado que esta bomba es bastante específica frente a sus sustratos (151) lo que nos sugiere que las modificaciones observadas sobre otras familias de antibióticos son debidas a determinantes de resistencia que acompañen a *qepA* en el plásmido.

En general, los genes *qepA* se han asociado a megaplasmidos de tipo IncF. Los plásmidos donde se ha detectado este gen en nuestro trabajo presentan un tamaño de aprox. 90 Kb (IncF) y 97 kb (IncF, IncFIB). El plásmido donde fue detectado *qepA2* en Francia (52) es de un tamaño aproximado de 90 Kb e IncF y el plásmido descrito en México de 145 Kb. IncF, IncFIA y IncFIB (152). Perichion *et al* (151), reporta *qepA* en un plásmido conjugativo de 100 Kb, IncF y Park *et al* (158), lo reportan en un plásmido de 125 Kb de tipo IncF.

*qepA* suele estar acompañado por *bla*<sub>TEM-1</sub> (52, 151, 152, 154, 157) , gen que también fue detectado en las electroporantes con *qepA* positivas, lo cual podría indicar la presencia de un transposon como parte del elemento movilizable.

Los secuenciotipos de los aislamientos de *E. coli* y sus grupos filogenéticos resultan ampliamente variables: el aislamiento de USA presento el ST405 filogrupo D, un clon que fue epidemiológicamente exitoso (157) al igual que el aislamiento UR1. Este clon por su alta virulencia (demostrada en un modelo animal) y la capacidad de capturar diferentes plataformas de BLEE y diseminarlos (149, 162).

Otros de los ST reportados son ST205 filogrupo D en México (152). El secuenciotipo de la cepa B2 que es ST68 también filogrupo D, reportado en Taiwan en aislamientos RCTG, como de fácil propagación clonal y estable dentro del ambiente hospitalario (163).

Todos estas variaciones en los ST sugieren una gran capacidad de diseminación de estos plásmidos presentándose en diferentes clones de *E. coli* y en otras especies como la *Enterobacter aerogenes* (158). Probablemente, este comportamiento esta a su vez respaldado por la vehiculización de *qepA* en plásmidos de tipo IncF, uno de los replicones plasmidicos mas frecuentemente encontrados en el grupo de las enterobacterias (164).

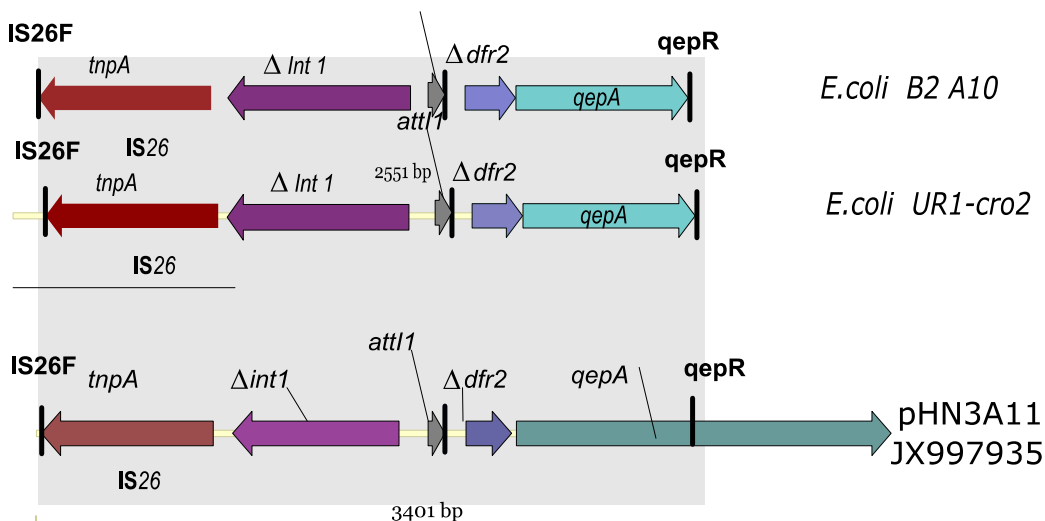
El análisis del entorno genético de *qepA* (para B2 y UR1 (Figura 49), muestra que la zona *upstream* esta flanqueada por IS26 al igual que lo encontrado en otras investigaciones realizadas tanto en *E. coli* como en *Enterobacter* (85, 151, 158) . Entre el gen *qepA* e IS26 se encontró un gen *dfr2* y una integrasa de clase 1, ambos truncados, esta estructura se encontró de forma idéntica a los plásmidos pHPA (85), pIP1206 (151), pHN3A11 (165).

Por el contrario, C27 no mostró los producto de amplificación esperados para la estructura anterior sugiriendo que IS26 no se encuentra en la misma zona *upstream* a este gen, lo mismo fue detectado en uno de los

aislamientos de corea (3) y en el plásmido BicA de Francia, donde se sugiere que la movilización de este determinante de resistencia esta mediada por ISCR3C (52).

Así mismo, en ninguno de los tres aislamientos se logró realizar mapeo en la región *downstream* a *qepA*, en particular, combinando con los *primers* de IS26, sugiriendo la ausencia de esta secuencia de inserción, al menos en una región cercana al mismo.

**Figura 49: Contexto genético de los aislamientos B2 y UR1**



Contexto genético de *qepA* en los aislamientos B2 y UR1. Las flechas indican las secuencias codificantes y la dirección de la transcripción.  $\Delta dfr2$ : indica el gen *dfr2* incompleto, *attI1*: el sitio de reconocimiento de *intI1*  $\Delta intI1$ : gen incompleto de la integrasa clase 1, *tnpA*: transposasa de IS26, el área en gris indica las zonas con 100 % de identidad. El área amplificada tiene un tamaño de 2.551 bp, PHN3A11 es el plásmido secuenciado por Xiaojien Chen *et al* (165).

Es necesario continuar con el mapeo de estos genes, especialmente caracterizar el entorno del gen en el aislamiento de C27 para saber si los cambios que poseen permiten su funcionalidad y que nivel de resistencia le confiere.

### 5.5.2 OqxAB

OqxAB es una bomba de eflujo de tipo RND detectada en diferentes géneros bacterianos como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella* y *Escherichia* (166-169). Hasta el momento no existen muchos datos epidemiológicos acerca de la misma frente a los otros PMQR, ya que fue solo recientemente conocida como tal.

Nuestros resultados obtenidos en los aislamientos productores de BLEE, mostraron una alta frecuencia de *oqxAB* en el género *Klebsiella* principalmente en la especie *K. pneumoniae*, la cual presenta una mayor frecuencia en los aislamientos de (Argentina 95,6 %, seguido de Colombia 92,3 % y Perú 72,7 %). Algunos estudios demuestran que estos genes se encuentran conservados en el cromosoma de esta especie y la frecuencia



detectada en aislamientos de *K. pneumoniae* productores de BLEE esta cercana del 60% en Irán (170) , 75% en China (166) y 74,6% en España. En este último estudio se demostró que en la mayoría de las *Klebsiella*, *oqxAB* se encontraba codificados tanto a nivel cromosómico como plasmídico y que la no detección por amplificación correlacionaba también con ensayos realizados por hibridación con sondas (171).

En Argentina se reportó la presencia de estos genes en el 91% de las *K. pneumoniae* y en 3 *K. oxytoca* en aislamientos con fenotipo inusual de sensibilidad a quinolonas, sobre los aislamientos clínicos que hacían parte de la colección del laboratorio de referencia nacional, recolectadas en el periodo 2005 a 2008 y donde parte de la población de estudio presentaba fenotipo BLEE (86).

Como lo señalan los estudios arriba mencionados, en este estudio encontramos que no necesariamente, esta bomba de eflujo, se encuentran en todas las *K. pneumoniae* (presente en el 88 %, 44/50), aunque esta particularidad se presentó en un número muy bajo de aislamientos. Esta ausencia también fue corroborado en el estudio español con hibridación con sonda (171).

Lamentablemente no llegamos a demostrar en los aislamientos de *Klebsiella* si la codificación era plásmidica o cromosómica, ni se estudiaron todos los posibles mecanismos cromosómicos (Porinas, QRDR) que pueden afectar los niveles de resistencia a fluoroquinolonas. Por ello no se puede concluir sobre la influencia de este mecanismo en los niveles de CIM a fluoroquinolonas observado.

Es claro es que ya sea se encuentren los genes a nivel cromosomal o plasmídicos, pueden ser fácilmente diseminados por transposones o por plásmidos siendo *K. pneumoniae* uno de los reservorios posibles, además de ser este un patógeno importante dentro del grupo de las enterobacterias.

Como *qxAB* además de expulsar antimicrobianos, expulsa desinfectantes, se ha sugerido que estos podrían co-seleccionar aislamientos con un mayor número de determinantes de resistencia en ambientes hospitalarios (170).

Sería interesante estudiar más a fondo los aislamientos de *K. oxytoca* y *E. gergoviae* que fueron positivos por PCR para esta *oqxAB*, ya que son pocos los estudios que se encuentran en estas especies. Existen algunas descripciones de esta bomba en *E. cloacae* y *E. aerogenes* pero más relacionado con su participación en la resistencia a tigeciclina (169). Sin embargo, generalmente su detección ha sido cromosomal (167, 171, 172).

Los primeros aislamientos clínicos en *E. coli* con *oqxAB* en un plásmido fueron reportados por Kim *et al* (172) y por Yuan *et al* (167).

De las *E. coli* analizadas, tres aislamientos de Perú presentaron los genes de la bomba *OqxAB* (3/14) En China se ha reportado una prevalencia 5,3%, en aislamientos de origen humano tanto de pacientes como de voluntarios (173) En Túnez no pudo ser encontrada en *E. coli* productores

de BLEE (174). Hasta el momento son pocos los estudios de prevalencia de aislamientos clínicos recuperados de humanos con esta bomba de eflujo.

En Argentina solo hay un reporte de una *E. coli* portadora de *oqxAB*, el cual proviene de un estudio multicéntrico realizado en el año 2007 que tenía como población totas 673 aislados de esta especie (175).

Dentro de las características de los aislamientos con *OqxAB* de Perú, dos de ellos, ER2 y ER3, presentan una estrecha relación clonal, con diferencias en el grupo filogenético y en el número de plasmidos ya sea por la adquisición o pérdida del mismo. Es extraña la diferencia en el grupo filogenético entre ER2 y ER3 (de B1 a D) y podría deberse a la adquisición del gen *chuA* por parte de ER3.

Quizá el origen de estos genes o de estos aislamientos de Perú podría deberse a las relaciones comerciales y a los procesos migratorios entre Perú con China que remontan al año 1849<sup>28</sup>. China presenta una alta prevalencia de *oqxAB*. En la provincia de Guandong se reportó una prevalencia de estos genes del 39 % para el año 2002 en *E. coli* aisladas de animales, granjeros y el medio ambiente (166). Otro de los estudios realizados en China muestra una prevalencia de *oqxAB* de 20,2 %. Este último estudio se llevo a cabo con *E. coli* de origen animal, ambiental y humano, con aislamientos recolectados entre los años 1993 al 2007 (173). Estos datos son más altos que los presentados en Dinamarca (1,8 %), Suecia (1,8 %) y el sur de corea (0,4 %) (7). En Perú la población de origen chino más grande de Latinoamérica.

Los tres aislamientos de Perú presentaron una co-existencia de genes que confieren resistencia a diferentes clase de antibióticos como lo es la presencia de *bla*<sub>CTX-M-65</sub> (resistencia a CTG), las dos mutaciones en *gyrA* (S83L, D87N) y una en *parC* (S80I) que confieren resistencia a las quinolonas, La presencia de *aac(6')-Ib-cr* detectada en uno de los tres aislamientos. Esto es alarmante y ha sido reportado en el informe de la OMS 2014 donde reporta el incremento de aislamientos multirresistentes a cefalosporinas, aminoglicósidos y quinolonas (1) .

Los tres aislamientos que presentan *OqxAB*, son el primer reporte de aislamientos detectados en Perú y en America, posteriormente nuestro grupo de investigación detectó el gen en un aislamiento en Bolivia (155), que a diferencia de los anteriores resultó portar el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y pertenecer al grupo filogenético B2, siendo este último también el primero en su tipo en America, quizá estos reportes sean marcadores de la emergencia de este gen en el continente.

También en este caso nos resta determinar si los plásmidos asociados a *oqxAB* son eventualmente transferibles por conjugación, como ya se ha reportado en otros trabajos (176); sería interesante saber si son conjugable y cual es la frecuencia de la misma, así como el nivel de

---

<sup>28</sup> (Aquino, Carlos (1 de marzo de 2014). Diario Oficial El Peruano (ed.): «El Perú y los países asiáticos». Consultado el 29 de marzo de 2014.)

resistencia que confiere a las quinolonas y la posible resistencia acompañante. También en este caso se ha reportado que esta bomba de expulsión no genera niveles de resistencia, pero si una disminución en la sensibilidad que facilitara la selección de mutantes altamente resistentes (176).

En nuestro estudio determinamos que los genes de *oqxAB* y *bla*<sub>CTX-M</sub> se encontraban en plásmidos diferentes, ya que fue posible electroporarlos en diferentes células receptoras. Liu *et al* (177) encontró que estos genes pueden encontrarse juntos en un plásmido transferible, pero estos plásmidos aun se encuentran en baja prevalencia. Lo que puede suceder es que los plásmidos cuenten con una estructura que permita que los dos genes se integren en el mismo elemento extracromosómico, debido a diferentes secuencias de inserción y así posteriormente propagarse como una unidad, que permita su co-selección por diferentes clases de antibióticos.

Algunos de nuestros plásmidos pertenecen a más de un grupo de incompatibilidad, esto ya ha sido detectado en otros estudios donde encontraron, al menos dos grupos Inc, detectándose, el grupo FII junto con FIB, o con HI2 o N (177). Se cree que esta característica se debe a la fusión de plásmidos como ya ha sido reportado por Carattoli (56).

Este mecanismo también fue detectado en plásmidos que no portan CTX-M con replicones tipo FIB, al igual que nosotros, o junto a otros replicones del grupo FII (176), aunque los genes de *oqxAB* fueron también encontrados en plásmidos que llevaban el replicon IncF (166, 177).

Los tres aislamientos presentaron el gen *bla*<sub>CTX-M-65</sub>. Estudios previos reportan la coexistencia entre *OqxAB* y BLEE, e incluso han detectado 10 tipos diferentes de CTX-M donde los aislamientos productores de CTX-M-65, procedían principalmente de porcinos y de aves (177).

En este trabajo, el gen *bla*<sub>CTX-M-65</sub> se encontró en un plásmido de aproximadamente 100 Kb de tipo IncI1, al igual que un aislamiento porcino, originario de Corea, que presentó el mismo grupo de incompatibilidad y la misma variante enzimática (CTX-M-65), (178). En otros trabajos, la presencia de esta variante de CTX-M, se ha asociado a plásmidos de tipo IncN en una estructura de movilización del tipo Tn1722, en una *E. coli* (179, 180) y en plásmidos de tipo IncFII acompañado de genes de tipo *rmtB* en China (159, 181).

Los tamaños reportados para plásmidos portadores de *oqxAB* varían entre 58 y 170 Kb (176), tamaños compatibles con los plásmidos que se describieron en este trabajo.

En el mapeo realizado en nuestros plásmidos para caracterizar el contexto genético, se encontraron entre cuatro y cinco marcos de lectura: dos correspondientes a los componentes de la bomba de eflujo *oqxAB*, uno al regulador transcripcional (*orf68*) y dos de ellos codificantes para transposasas de la familia IS6 (IS26 e IS15DI). Una de las transposasas mostró una identidad de 100 % con la de IS26 (sobre 813 nucleótidos de

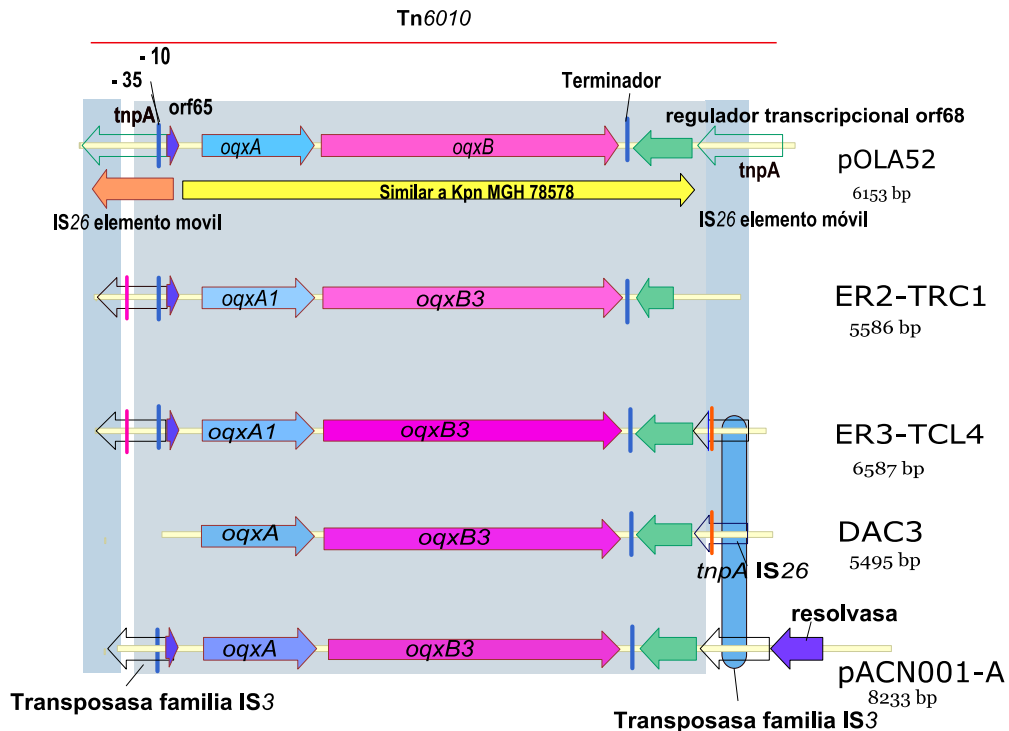
un total de 914), encontrados en los electroporantes de ER3 y DAC3; la otra transposasa presenta una similitud de 99% con IS15DI, detectado en las electroporantes de ER2 y ER3, IS15DI difiere en tres nucleótidos con IS26.

En la caracterización de *oqxAB* se observó la proteína de secreción OqxA, compatible con el alélo A1 y la bomba de expulsión OqxB3, Esta misma combinación *oqxA1* y *oqxB3* fue reportado por Yuan, J.Y. *et al* col 2009 en un aislamiento clínico de *E. coli* denominado E003 (GenBank JF912901.1) (167)

Estudios anteriores ya han encontrado el gen de *oqxA* flanqueada por IS26 (172, 177), sugiriendo que esta IS podría tener un papel importante en el proceso de captura y movilización de esta bomba de eflujo.

Las similitudes con pOLA52 (NC\_010378) y el plásmido pACN001 (KC853434.1) se observan en la Figura 50, donde se muestra las similitudes y se destacan los cambios que se producen principalmente en las secuencias de inserción. No fue posible amplificar esta secuencia de inserción en el aislamiento DAC3, por lo que es posible que tenga un entorno genético upstream diferente. En pOLA52 se encontró que *oqxAB* se encuentra en forma de gen en casete y el mismo (*oqxA*, *oqxB* y *orf68*) presenta una identidad del 99 % con la región del cromosoma homóloga de *K. pneumoniae* MHG 78578 (182), en nuestro estudio no logramos el cubrimiento total en todos los aislamientos pero se observa una gran similitud con lo descrito en este plásmido donde la región completa constituye un transposon compuesto denominado Tn6010.

**Figura 50: Entorno genético de *oqxA* y *oqxB***



En la figura se observa el alineamiento de los aislamientos estudiados comparados con pOLA52 y pACN001-A, el fragmento sombreado muestra la similitud en las secuencias, -10 y -35: Cajas promotoras *orf65*: proteína recombinante, *oqxA*: proteína de fusión de membrana, *oqxB*: bomba de eflujo, *orf68* regulador transcripcional, la línea fucsia muestra el sitio con diferencias de las trasposasas (*tnpA*) de las electroporantes frente a pOLA52. La *tnpA* de la parte superior del gen de *oqxA* pOLA52 y pACN001-A son iguales, aunque presentan menor tamaño la de pACN001-A. En la parte inferior la diferencia (línea naranja) se presenta frente a la *tnpA* del plásmido pACN001-A; La flecha amarilla muestra el fragmento que presenta un 99 % de similitud con *K. pneumoniae* MGH78578, La línea roja sobre pOLA52 indica el fragmento que hace parte del transposon Tn6010.

El regulador *orf68*, forma parte del Tn6010, lo que sugiere que también se localiza en el cromosoma de *Klebsiella*. El nivel de participación de este regulador en el operon de OqxAB aun es desconocido, por otra parte *orf65* codifica para una proteína InsA la cual es importante en los procesos de transposición (182).

Como se menciono anteriormente los ST y grupos filogenéticos de los aislamientos de *E. coli* con *oqxAB* (cepa-ST-grupo filogenético) fueron ER2-ST602-B1, ER3-ST602-D y DAC3-ST448-B1. El secuenciotipo ST602 ha sido encontrado en aislamientos de origen humano en España (183), en aislados de alimentos (184) en cepas uropatogenas en gatos (185) y en aislamientos extraintestinales en porcinos (186). En los casos mencionados anteriormente eran productores de BLEE diferentes a CTX-M-65.

El secuenciotipo ST448 ha sido detectado tanto en aislamientos de origen humano como animal. El ST448-B1, ha sido detectado en España en dos aislamientos clínicos humanos de *E. coli* resistentes a carbapenemes. Uno de ellos provino de una muestra de orina y se le detectó los genes resistencia *bla*<sub>NDM-5</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>CMY-42</sub> y *rmtB* (187); el otro aislamiento fue agente causal de una sepsis urinaria fatal y resultó ser portador de *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>KPC-3</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>OXA-9</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> y *bla*<sub>CMY-2</sub> (188).

Por otra parte, se ha sugerido que este ST es una posible fuente de transmisión en las aves de corral (189), y ha sido asociado a la presencia de BLEE, diferentes a las encontradas en nuestro estudio.

Si bien el grupo filogenético B1 ha sido asociado a *E. coli* comensales, lo expuesto anteriormente muestra la capacidad de evolución de este aislamiento inicialmente considerado como comensal, al aceptar diversos genes, asociados a estructuras de movilización como IS, ISCR y Tn, convirtiéndolas en aislamientos difíciles de manejar con antibioticoterapia.

Aunque otros autores no encontraron secuenciotipos que relacione los aislamientos humanos con los aislamientos animales (190), nuestro análisis permite evaluar la posible transferencia lateral de genes de resistencia entre aislamientos clínicos y entre estos y aislamiento

provenientes de animales o alimentos, los cuales pueden actuar como reservorio de genes (como es el caso de *oqxAB* y de *bla*<sub>CTX-M-65</sub>).



# Conclusiones

---





## 6.0 CONCLUSIONES

- Los aislamientos analizados resistentes a cefalosporinas de tercera generación (RCTG) presentaron bajos niveles de sensibilidad a quinolonas y fluoroquinolonas principalmente los aislamientos de Perú y Argentina (NAL menor 15 %, CIP, LVX y GAT menor al 26 %).
- Los aislamientos de Colombia SCTG, presentan un mayor nivel de sensibilidad (NAL 46,8 %) y CIP (68,7 %) en comparación a los RCTG (NAL 13 %, CIP 26,8 %), aunque las dos poblaciones mostraron niveles similares de sensibilidad a LVX (SCTG 68,7 % y RCTG 65,2 %).
- Entre los aminoglicósidos, la tobramicina fue la más afectada por los diferentes mecanismos de resistencia, mientras que la AMK fue la menos afectada. Las mutaciones cromosomales en las regiones QRDR de la DNA girasa y la topoisomerasa IV, están asociadas a los aislamientos con altos niveles de resistencia a quinolonas y fluoroquinolonas.
- La asociación los mecanismos PMQR en los aislamientos RCTG es muy alta, ya que la frecuencia en la que se presentan es mayor al 67%, independientemente del origen de los aislamientos.
- Los determinantes de PMQR se hallaron en las distintas especies de enterobacterias, y la distribución de los mismos difiere según el origen de la población analizada.
- El gen *aac(6′)-Ib-cr* fue el determinante PMQR mas prevalente en las poblaciones estudiadas, seguido de *qnrB*.
- La población de Argentina presentó mayor diversidad de alelos de tipo *qnrB* siendo predominante *qnrB2*, mientras que en Colombia y Perú los alelos predominantes fueron *qnrB1* y *qnrB19*, respectivamente.
- Se encontró una fuerte asociación entre la presencia de *aac(6′)-Ib-cr* en aislamientos portadores de CTX-M del grupo 1 en Argentina (*bla<sub>CTX-M-15</sub>*) y Perú
- Los grupos filogenéticos predominantes en la población de *E. coli* RCTG portadores de genes PMQR son B2, en Argentina y Perú, y D en Colombia, ambos filogrupos considerados virulentos.
- El gen *qepA1*, se presentó en una baja frecuencia en Perú y Colombia, además estegeno fue detectado en los aislamientos de Argentina RCTG.
- Se describe el primer aislamiento clínico SCTG de *E. coli* (B2) con *qepA*, *qnrB10* y *aac(6′)-Ib-cr* en Argentina y Sudamérica, siendo caracterizado como ST68 y grupo filogenético D.
- Se realizó la primer descripción de *qepA* en un aislamientos de *E. coli* (UR1) portadora de *bla<sub>CTX-M-14</sub>*, de Perú, y se caracterizó como ST405, grupo filogenético D

- Además, se describió el mismo determinante en un aislamiento de *E. coli* del grupo filogenético B2 (C27), portador de *bla*<sub>CTX-M-2</sub> y una AmpC del *cluster* CIT, procedente de Colombia.
- Los aislamientos de B2 y UR1 presentaron altos niveles de resistencia a quinolonas (NAI >512 µgr/ml) y fluoroquinolonas (CIP, LVX y GAT 64 y >64 µgr/ml), presentando mutaciones en la girasa (S83L, D87N) y la topoisomerasa IV (S80I, E87G); estas mutaciones no se detectaron en el aislamiento C27.
- B2 y UR1 presentaron el alelo *qepA1*, mientras que la variante alélica (nueva) fue 99% idéntica a los dos alelos reportados para este gen.
- Los plásmidos portadores de *qepA* en los aislamientos de B2 y UR1 (no conjugables en nuestras condiciones de experimentación), son del grupo IncF, IncFIB e IncF, con tamaños aproximados de 97 Kb y 90 Kb, respectivamente. Los transformantes obtenidos incrementaron el nivel de CIM a CIP al menos 7 a 8 veces respecto al nivel de la receptora
- El entorno genético *upstream* al gen *qepA1* (en B2 y UR1) mostró la presencia de la transposasa de IS26, del gen *dfr2* truncado y de la integrasa de un integrón de clase 1 truncado. El entorno de *qepA* del aislamiento C27 no pudo caracterizarse
- Los genes *oqxAB* se detectaron en *K. pneumoniae* productoras de BLEE en una frecuencias de 72,7 al 95,6%, donde la menor frecuencia se observó en Perú, seguida de Colombia y Argentina.
- No se detectaron genes *oqxAB* en *E. coli* aisladas en Argentina y en Colombia, mientras que Perú presentó una frecuencia de 27,3 % (3/11).
- En este estudio se realizó el primer reporte de aislamientos de *E. coli* con *oqxAB* en América y en Perú, así como la caracterización de los mismos, sugiriendo la emergencia en nuestro continente de este determinante de resistencia.
- Los tres aislamientos de *E. coli* *oqxAB* positivos presentaron simultáneamente el gen *bla*<sub>CTX-M-65</sub>. Dos de los aislamientos pertenecían al ST602 y uno al ST448.
- La caracterización de los plásmidos permitió determinar que los genes de *oqxAB* se localizan en plásmidos de tamaño aproximado a 90 y 100 Kb, presentando grupos de Inc *F*, *FIB*, *K*, mientras que el plásmido portador de *bla*<sub>CTX-M-65</sub>, un tamaño aproximado a 100 Kb correspondió al grupo *Incl1*.
- Al menos en uno de los tres plásmidos, los genes *oqxAB* están flanqueados por secuencias de inserción de la familia IS6, Las cuales podrían estar implicadas en la captura y movilización de *oqxAB*.
- En nuestro conocimiento este es el primer estudio que determina la frecuencia de determinantes PMQR en aislamientos RCTG de

Argentina, Perú y Colombia. Además, se destaca en este trabajo la descripción del primer aislamiento con *qepA* en Argentina y la caracterización de los tres aislamientos de *E. coli* con *oqxAB* en Perú.



# **Bibliografía**

---



## 7.0 BIBLIOGRAFÍA

1. WHO, W.H.O., editor. 2014. *Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance*.
2. E.C.D.P.C., editor. 2012. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011*.
3. Kim, E.S., Jeong, J.Y., Choi, S.H., Lee, S.O., Kim, S.H., Kim, M.N., Woo, J.H., and Kim, Y.S. 2009. Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene *qepA* in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65:335-338.
4. Chandran, S.P., Diwan, V., Tamhankar, A.J., Joseph, B.V., Rosales-Klitz, S., Mundayoor, S., Lundborg, C.S., and Macaden, R. 2014. Detection of carbapenem resistance genes and cephalosporin, and quinolone resistance genes along with *oqxAB* gene in *Escherichia coli* in hospital wastewater: a matter of concern. *J Appl Microbiol* 117:984-995.
5. Ma, J., Zeng, Z., Chen, Z., Xu, X., Wang, X., Deng, Y., Lu, D., Huang, L., Zhang, Y., Liu, J., et al. 2009. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob Agents Chemother* 53:519-524.
6. Bartoloni, A., Pallecchi, L., Riccobono, E., Mantella, A., Magnelli, D., Di Maggio, T., Villagran, A.L., Lara, Y., Saavedra, C., Strohmeyer, M., et al. 2013. Relentless increase of resistance to fluoroquinolones and expanded-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli*: 20 years of surveillance in resource-limited settings from Latin America. *Clin Microbiol Infect* 19:356-361.
7. Rodriguez-Martinez, J.M., Cano, M.E., Velasco, C., Martinez-Martinez, L., and Pascual, A. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* 17:149-182.
8. Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., and Robicsek, A. 2009. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 22:664-689.
9. Robicsek, A., Jacoby, G.A., and Hooper, D.C. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 6:629-640.
10. Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., and Mietzner, T.A. 2001. Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica. Estados Unidos.: Mc Graw-Hill-Lange. 694.
11. Famiglietti, A., Quinteros, M., Vazquez, M., Marin, M., Nicola, F., Radice, M., Galas, M., Pasteran, F., Bantar, C., Casellas, J.M., et al. 2005. [Consensus for antimicrobial susceptibility testing for Enterobacteriaceae. Subcommittee on Antimicrobials, SADEBAC (Argentinian Society of Clinical Bacteriology), Argentinian Association of Microbiology]. *Rev Argent Microbiol* 37:57-66.
12. Jiang, X., Li, J., Zhang, Y., Yan, H., Wang, Y., Shi, L., and Zhou, L. 2014. Detection of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and *qnrS* expression in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Infect Dev Ctries* 8:1625-1629.



13. Livermore, D.M. 2012. Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob Agents* 39:283-294.
14. E.C.D.P.C. 2013. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2013. 211.
15. PW., K. 2011. Antimicrobial resistance in the age of noncommunicable diseases. *Rev Panam Salud Publica*. 30:513-518.
16. OPS. 2011. Informe Anual De La Red De Monitoreo / Vigilancia De La Resistencia A Los Antibióticos. *Revista de Patología Tropical* 40.
17. Berezin, E.N., and Solorzano, F. 2014. Gram-negative infections in pediatric and neonatal intensive care units of Latin America. *J Infect Dev Ctries* 8:942-953.
18. Briceno, D.F., Correa, A., Valencia, C., Torres, J.A., Pacheco, R., Montealegre, M.C., Ospina, D., and Villegas, M.V. 2010. [Antimicrobial resistance of Gram negative bacilli isolated from tertiary-care hospitals in Colombia]. *Biomedica* 30:371-381.
19. Maldonado, N.A., Munera, M.I., Lopez, J.A., Sierra, P., Robledo, C., and Robledo, J. 2014. [Trends in antibiotic resistance in Medellin and municipalities of the Metropolitan Area between 2007 and 2012: Results of six years of surveillance]. *Biomedica* 34:433-446.
20. Leal, A.L., Cortes, J.A., Arias, G., Ovalle, M.V., Saavedra, S.Y., Buitrago, G., Escobar, J.A., and Castro, B.E. 2013. [Emergence of resistance to third generation cephalosporins by Enterobacteriaceae causing community-onset urinary tract infections in hospitals in Colombia]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 31:298-303.
21. Salles, M.J., Zurita, J., Mejia, C., and Villegas, M.V. 2013. Resistant gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. *Epidemiol Infect* 141:2459-2472.
22. Canton, R., and Coque, T.M. 2006. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 9:466-475.
23. Seral Garcia, C., Pardos de la Gandara, M., and Castillo Garcia, F.J. 2010. [Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28 Suppl 1:12-18.
24. Calvo, J., Cantón, R., Cuenca, F.F., Mirelis, B., and Navarro, F. 2011. Detección fenotípica de Mecanismo de Resistencia en gramnegativos.54.
25. Bush, K., and Fisher, J.F. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 65:455-478.
26. Gutkind, G.O., Di Conza, J., Power, P., and Radice, M. 2013. beta-lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. *Curr Pharm Des* 19:164-208.
27. Bonnet, R. 2004. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1-14.
28. Poirel, L., Cattoir, V., and Nordmann, P. 2012. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front Microbiol* 3:24.
29. Pallecchi, L., Bartoloni, A., Riccobono, E., Fernandez, C., Mantella, A., Magnelli, D., Mannini, D., Strohmeyer, M., Bartalesi, F., Rodriguez, H., et

- al. 2012. Quinolone resistance in absence of selective pressure: the experience of a very remote community in the Amazon forest. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1790.
30. Guan, X., Xue, X., Liu, Y., Wang, J., Wang, Y., Wang, K., Jiang, H., Zhang, L., Yang, B., Wang, N., et al. 2013. Plasmid-mediated quinolone resistance--current knowledge and future perspectives. *J Int Med Res* 41:20-30.
  31. Davidson, R.J., Davis, I., Willey, B.M., Rizg, K., Bolotin, S., Porter, V., Polsky, J., Daneman, N., McGeer, A., Yang, P., et al. 2008. Antimalarial therapy selection for quinolone resistance among *Escherichia coli* in the absence of quinolone exposure, in tropical South America. *PLoS One* 3:e2727.
  32. Leshner, G.Y., Froelich, E.J., Gruett, M.D., Bailey, J.H., and Brundage, R.P. 1962. 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *J Med Pharm Chem* 91:1063-1065.
  33. Ball, P. 2000. Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother* 46 Suppl T1:17-24.
  34. Chen, C.R., Malik, M., Snyder, M., and Drlica, K. 1996. DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *J Mol Biol* 258:627-637.
  35. Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J., and Zhao, X. 2008. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* 52:385-392.
  36. Drlica, K., and Zhao, X. 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:377-392.
  37. Nam, Y.S., Cho, S.Y., Yang, H.Y., Park, K.S., Jang, J.H., Kim, Y.T., Jeong, J.W., Suh, J.T., and Lee, H.J. 2013. Investigation of mutation distribution in DNA gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin-non-susceptible Enterobacteriaceae isolated from blood cultures in a tertiary care university hospital in South Korea, 2005-2010. *Int J Antimicrob Agents* 41:126-129.
  38. Ruiz, J. 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 51:1109-1117.
  39. Heddle, J., and Maxwell, A. 2002. Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. *Antimicrob Agents Chemother* 46:1805-1815.
  40. Vila, J., Ruiz, J., Goni, P., and De Anta, M.T. 1996. Detection of mutations in *parC* in quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 40:491-493.
  41. Soussy, C.J., Wolfson, J.S., Ng, E.Y., and Hooper, D.C. 1993. Limitations of plasmid complementation test for determination of quinolone resistance due to changes in the gyrase A protein and identification of conditional quinolone resistance locus. *Antimicrob Agents Chemother* 37:2588-2592.
  42. Singh, R., Swick, M.C., Ledesma, K.R., Yang, Z., Hu, M., Zechiedrich, L., and Tam, V.H. 2012. Temporal interplay between efflux pumps and target mutations in development of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1680-1685.

43. Soriano, F. 2001. [Selection of antibiotic-resistant bacteria: microbiological and pharmacological factors]. *Med Clin (Barc)* 117:632-636.
44. Canton, R., and Morosini, M.I. 2011. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 35:977-991.
45. Xiong, X., Bromley, E.H., Oelschlaeger, P., Woolfson, D.N., and Spencer, J. 2011. Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res* 39:3917-3927.
46. Martinez-Martinez, L., Pascual, A., and Jacoby, G.A. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* 351:797-799.
47. Cattoir, V., Poirel, L., Mazel, D., Soussy, C.J., and Nordmann, P. 2007. *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2650-2651.
48. Jacoby, G.A., Walsh, K.E., Mills, D.M., Walker, V.J., Oh, H., Robicsek, A., and Hooper, D.C. 2006. *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1178-1182.
49. Jacoby, G.A., Griffin, C.M., and Hooper, D.C. 2011. *Citrobacter* spp. as a source of *qnrB* Alleles. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4979-4984.
50. Wang, M., Guo, Q., Xu, X., Wang, X., Ye, X., Wu, S., and Hooper, D.C. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene *qnrC* found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1892-1897.
51. Hu, Y.Y., Cai, J.C., Zhang, R., Zhou, H.W., Sun, Q., and Chen, G.X. 2012. Emergence of *Proteus mirabilis* harboring *bla*<sub>KPC-2</sub> and *qnrD* in a Chinese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2278-2282.
52. Cattoir, V., Poirel, L., and Nordmann, P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3801-3804.
53. Hansen, L.H., Johannesen, E., Burmolle, M., Sorensen, A.H., and Sorensen, S.J. 2004. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:3332-3337.
54. Robicsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Park, C.H., Bush, K., and Hooper, D.C. 2006. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 12:83-88.
55. Vetting, M.W., Park, C.H., Hegde, S.S., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., and Blanchard, J.S. 2008. Mechanistic and structural analysis of aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-Ib and its bifunctional, fluoroquinolone-active AAC(6')-Ib-cr variant. *Biochemistry* 47:9825-9835.
56. Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., and Threlfall, E.J. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63:219-228.

57. Francia, M.V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M.P., Latorre, A., Drainas, C., and de la Cruz, F. 2004. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* 28:79-100.
58. Carattoli, A. 2009. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2227-2238.
59. Garcillan-Barcia, M.P., and de la Cruz, F. 2013. Ordering the bestiary of genetic elements transmissible by conjugation. *Mob Genet Elements* 3:e24263.
60. Garcia-Fernandez, A., Chiaretto, G., Bertini, A., Villa, L., Fortini, D., Ricci, A., and Carattoli, A. 2008. Multilocus sequence typing of IncII plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother* 61:1229-1233.
61. Ruiz, J., Pons, M.J., and Gomes, C. 2012. Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int J Antimicrob Agents* 40:196-203.
62. Garza-Ramos, U., Barrios, H., Hernandez-Vargas, M.J., Rojas-Moreno, T., Reyna-Flores, F., Tinoco, P., Othon, V., Poirel, L., Nordmann, P., Cattoir, V., et al. 2012. Transfer of quinolone resistance gene *qnrA1* to *Escherichia coli* through a 50 kb conjugative plasmid resulting from the splitting of a 300 kb plasmid. *J Antimicrob Chemother* 67:1627-1634.
63. Guillard, T., Grillon, A., de Champs, C., Cartier, C., Madoux, J., Bercot, B., Lebreil, A., Lozniewski, A., Riahi, J., Vernet-Garnier, V., et al. 2014. Mobile Insertion Cassette Elements Found in Small Non-Transmissible Plasmids in *Proteaeae* May Explain *qnrD* Mobilization. *PLoS One* 9:1-8.
64. Richter, S.N., Frasson, I., Bergo, C., Manganelli, R., Cavallaro, A., and Palu, G. 2010. Characterisation of *qnr* plasmid-mediated quinolone resistance in Enterobacteriaceae from Italy: association of the *qnrB19* allele with the integron element *ISCR1* in *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 35:578-583.
65. Zhao, J.Y., and Dang, H. 2012. Coastal seawater bacteria harbor a large reservoir of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Jiaozhou Bay, China. *Microb Ecol* 64:187-199.
66. Carattoli, A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res* 32:243-259.
67. Di Conza, J.A., and Gutkind, G.O. 2010. [Integrons: gene collectors]. *Rev Argent Microbiol* 42:63-78.
68. Sennati, S., Santella, G., Di Conza, J., Pallecchi, L., Pino, M., Ghiglione, B., Rossolini, G.M., Radice, M., and Gutkind, G. 2012. Changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother* 56:6003-6005.
69. Sevilla, A.C., Puray, C.M., Alarcon, V.J., Cabezas S, C., Guevara, D.J., Valencia, B.E., Porto, A., Ghiglione, B., Radice, M., Di Conza, J., et al. 2011. Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases in Different Enterobacteria Isolated in Lima, Peru. Chicago: 51 ICAAC.
70. Di Conza, J., Ayala, J.A., Power, P., Mollerach, M., and Gutkind, G. 2002. Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*<sub>CTX-M-2</sub> in *Salmonella enterica* serovar infantis. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2257-2261.

71. Power, P., Galleni, M., Di Conza, J., Ayala, J.A., and Gutkind, G. 2005. Description of In116, the first blaCTX-M-2-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. *J Antimicrob Chemother* 55:461-465.
72. Cejas, D., Fernandez Canigia, L., Rincon Cruz, G., Elena, A.X., Maldonado, I., Gutkind, G.O., and Radice, M.A. 2014. First isolate of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 from the Americas. *J Clin Microbiol* 52:3483-3485.
73. Institute, C.C.a.L.S. 2011. Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. In *M100-S21*. 1.
74. Institute., C.C.a.L.S., editor. 2012. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 179 pp.
75. Kado, C.I., and Liu, S.T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 145:1365-1373.
76. Sambrook Joseph, and Michael, G., editors. 2012. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*: Harbor Laboratory Press.
77. Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3 vol.
78. Miranda, G., Kelly, C., Solorzano, F., Leanos, B., Coria, R., and Patterson, J.E. 1996. Use of pulsed-field gel electrophoresis typing to study an outbreak of infection due to *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 34:3138-3141.
79. Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66:4555-4558.
80. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., and Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233-2239.
81. Fang, F.C., Sandler, N., and Libby, S.J. 2005. Liver abscess caused by magA *Klebsiella pneumoniae* in North America. *J Clin Microbiol* 43:991-992.
82. Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C., Ochman, H., et al. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60:1136-1151.
83. Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P.A., and Brisse, S. 2005. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 43:4178-4182.
84. Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., and Grimont, P. 2009. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 4:e4982.
85. Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T., and Arakawa, Y. 2007. New plasmid-mediated

- fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3354-3360.
86. Andres, P., Lucero, C., Soler-Bistue, A., Guerriero, L., Albornoz, E., Tran, T., Zorreguieta, A., Galas, M., Corso, A., Tolmasky, M.E., et al. 2013. Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 57:2467-2475.
  87. Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K.M., and Bonomo, R.A. 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 7:459-469.
  88. Fu, Y., Zhang, W., Wang, H., Zhao, S., Chen, Y., Meng, F., Zhang, Y., Xu, H., Chen, X., and Zhang, F. 2013. Specific patterns of *gyrA* mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *BMC Infect Dis* 13:8.
  89. Brink, A.J., Botha, R.F., Poswa, X., Senekal, M., Badal, R.E., Grolman, D.C., Richards, G.A., Feldman, C., Boffard, K.D., Veller, M., et al. 2012. Antimicrobial susceptibility of gram-negative pathogens isolated from patients with complicated intra-abdominal infections in South African hospitals (SMART Study 2004-2009): impact of the new carbapenem breakpoints. *Surg Infect (Larchmt)* 13:43-49.
  90. Brisse, S., Milatovic, D., Fluit, A.C., Verhoef, J., Martin, N., Scheuring, S., Kohrer, K., and Schmitz, F.J. 1999. Comparative in vitro activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, and *Enterobacter aerogenes* clinical isolates with alterations in GyrA and ParC proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 43:2051-2055.
  91. Hoban, D.J., Nicolle, L.E., Hawser, S., Bouchillon, S., and Badal, R. 2011. Antimicrobial susceptibility of global inpatient urinary tract isolates of *Escherichia coli*: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program: 2009-2010. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70:507-511.
  92. Morgan-Linnell, S.K., Becnel Boyd, L., Steffen, D., and Zechiedrich, L. 2009. Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 53:235-241.
  93. Kumagai, Y., Kato, J.I., Hoshino, K., Akasaka, T., Sato, K., and Ikeda, H. 1996. Quinolone-resistant mutants of *Escherichia coli* DNA topoisomerase IV *parC* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 40:710-714.
  94. Sato, T., Yokota, S., Uchida, I., Okubo, T., Usui, M., Kusumoto, M., Akiba, M., Fujii, N., and Tamura, Y. 2013. Fluoroquinolone resistance mechanisms in an *Escherichia coli* isolate, HUE1, without quinolone resistance-determining region mutations. *Front Microbiol* 4:125.
  95. Murray, A., Mather, H., Coia, J.E., and Brown, D.J. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance in nalidixic-acid-susceptible strains of *Salmonella enterica* isolated in Scotland. *J Antimicrob Chemother* 62:1153-1155.
  96. Villalobos Rodriguez, A.P., Diaz Ortega, M.H., Barrero Garzon, L.I., Rivera Vargas, S.M., Henriquez Iguaran, D.E., Villegas Botero, M.V.,

- Robledo Restrepo, C.G., and Leal Castro, A.L. 2011. [Trends of bacterial resistance phenotypes in high-complexity public and private hospitals in Colombia]. *Rev Panam Salud Publica* 30:627-633.
97. Organization., P.-A.H. 2010. Annual Report of the Latin American Network for Surveillance of Antimicrobial Resistance. *San Jose* Costa Rica.
98. Slama, T.G. 2008. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. *Crit Care* 12 Suppl 4:S4.
99. Johnson, J.R., Menard, M., Johnston, B., Kuskowski, M.A., Nichol, K., and Zhanel, G.G. 2009. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2733-2739.
100. Siu, L.K., Fung, C.P., Chang, F.Y., Lee, N., Yeh, K.M., Koh, T.H., and Ip, M. 2011. Molecular typing and virulence analysis of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from liver abscess patients and stool samples from noninfectious subjects in Hong Kong, Singapore, and Taiwan. *J Clin Microbiol* 49:3761-3765.
101. Brisse, S., and Verhoef, J. 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol* 51:915-924.
102. Damjanova, I., Toth, A., Paszti, J., Hajbel-Vekony, G., Jakab, M., Berta, J., Milch, H., and Fuzi, M. 2008. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSAs'? *J Antimicrob Chemother* 62:978-985.
103. Lascols, C., Peirano, G., Hackel, M., Laupland, K.B., and Pitout, J.D. 2013. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 57:130-136.
104. Vila, A., Cassata, A., Pagella, H., Amadio, C., Yeh, K.M., Chang, F.Y., and Siu, L.K. 2011. Appearance of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess syndrome in Argentina: case report and review of molecular mechanisms of pathogenesis. *Open Microbiol J* 5:107-113.
105. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Yamanaka, L.M., and Nakamura, S. 1991. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 35:1647-1650.
106. Khodursky, A.B., Zechiedrich, E.L., and Cozzarelli, N.R. 1995. Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11801-11805.
107. Belland, R.J., Morrison, S.G., Ison, C., and Huang, W.M. 1994. *Neisseria gonorrhoeae* acquires mutations in analogous regions of *gyrA* and *parC* in fluoroquinolone-resistant isolates. *Mol Microbiol* 14:371-380.
108. Deguchi, T., Fukuoka, A., Yasuda, M., Nakano, M., Ozeki, S., Kanematsu, E., Nishino, Y., Ishihara, S., Ban, Y., and Kawada, Y. 1997. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 41:699-701.

109. Bansal, S., and Tandon, V. 2011. Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 37:253-255.
110. Kitamura, A., Hoshino, K., Kimura, Y., Hayakawa, I., and Sato, K. 1995. Contribution of the C-8 substituent of DU-6859a, a new potent fluoroquinolone, to its activity against DNA gyrase mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1467-1471.
111. Rhomberg, P.R., and Jones, R.N. 2009. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). *Diagn Microbiol Infect Dis* 65:414-426.
112. Deguchi, T., Yasuda, M., Nakano, M., Ozeki, S., Kanematsu, E., Nishino, Y., Ishihara, S., and Kawada, Y. 1997. Detection of mutations in the *gyrA* and *parC* genes in quinolone-resistant clinical isolates of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 40:543-549.
113. Baudry, P.J., Nichol, K., DeCorby, M., Lagace-Wiens, P., Olivier, E., Boyd, D., Mulvey, M.R., Hoban, D.J., and Zhanel, G.G. 2009. Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of QepA in North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63:319-326.
114. Saenz, Y., Zarazaga, M., Brinas, L., Ruiz-Larrea, F., and Torres, C. 2003. Mutations in *gyrA* and *parC* genes in nalidixic acid-resistant *Escherichia coli* strains from food products, humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 51:1001-1005.
115. Fu, Y., Guo, L., Xu, Y., Zhang, W., Gu, J., Xu, J., Chen, X., Zhao, Y., Ma, J., Liu, X., et al. 2008. Alteration of GyrA amino acid required for ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2980-2983.
116. Jakobsen, L., Cattoir, V., Jensen, K.S., Hammerum, A.M., Nordmann, P., and Frimodt-Moller, N. 2012. Impact of low-level fluoroquinolone resistance genes *qnrA1*, *qnrB19* and *qnrS1* on ciprofloxacin treatment of isogenic *Escherichia coli* strains in a murine urinary tract infection model. *J Antimicrob Chemother* 67:2438-2444.
117. Wang, J., Stephan, R., Karczmarczyk, M., Yan, Q., Hachler, H., and Fanning, S. 2013. Molecular characterization of *bla* ESBL-harboring conjugative plasmids identified in multi-drug resistant *Escherichia coli* isolated from food-producing animals and healthy humans. *Front Microbiol* 4:188.
118. Poirel, L., Leviandier, C., and Nordmann, P. 2006. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in *Enterobacteriaceae* isolates from a French university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3992-3997.
119. Karisik, E., Ellington, M.J., Pike, R., Warren, R.E., Livermore, D.M., and Woodford, N. 2006. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 beta-lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 58:665-668.
120. Calvo, J., Cano, M.E., Pitart, C., Marco, F., Rodriguez-Martinez, J.M., Pascual, A., and Martinez-Martinez, L. 2011. Evaluation of three



- automated systems for susceptibility testing of enterobacteria containing *qnrB*, *qnrS*, and/or *aac(6')-Ib-cr*. *J Clin Microbiol* 49:3343-3345.
121. Rodriguez-Martinez, J.M., Conejo, M.C., Martinez-Martinez, L., Cano, M.E., Velasco, C., and Pascual, A. 2005. Evaluation of antimicrobial susceptibility of bacteria containing the *qnr* gene and FOX-5 beta-lactamase by four automated systems. *Clin Microbiol Infect* 11:402-404.
  122. Quiroga, M.P., Andres, P., Petroni, A., Soler Bistue, A.J., Guerriero, L., Vargas, L.J., Zorreguieta, A., Tokumoto, M., Quiroga, C., Tolmasky, M.E., et al. 2007. Complex class 1 integrons with diverse variable regions including *aac(6')-Ib-cr*, and a novel allele *qnrB10* associated with ISCR1 in clinical enterobacterial isolates from Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4466-4470.
  123. Pallecchi, L., Riccobono, E., Mantella, A., Bartalesi, F., Sennati, S., Gamboa, H., Gotuzzo, E., Bartoloni, A., and Rossolini, G.M. 2009. High prevalence of *qnr* genes in commensal enterobacteria from healthy children in Peru and Bolivia. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2632-2635.
  124. Riveros, M., Riccobono, E., Durand, D., Mosquito, S., Ruiz, J., Rossolini, G.M., Ochoa, T.J., and Pallecchi, L. 2012. Plasmid-mediated quinolone resistance genes in enteroaggregative *Escherichia coli* from infants in Lima, Peru. *Int J Antimicrob Agents* 39:540-542.
  125. Cattoir, V., Nordmann, P., Silva-Sanchez, J., Espinal, P., and Poirel, L. 2008. ISEcp1-mediated transposition of *qnrB*-like gene in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2929-2932.
  126. Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C.J., and Nordmann, P. 2007. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother* 60:394-397.
  127. Viana, A.L., Cayo, R., Avelino, C.C., Gales, A.C., Franco, M.C., and Minarini, L.A. 2013. Extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated in Brazil carry distinct types of plasmid-mediated quinolone resistance genes. *J Med Microbiol* 62:1326-1331.
  128. Escobar Perez, J.A., Olarte Escobar, N.M., Castro-Cardozo, B., Valderrama Marquez, I.A., Garzon Aguilar, M.I., Martinez de la Barrera, L., Barrero Barreto, E.R., Marquez-Ortiz, R.A., Moncada Guayazan, M.V., and Vanegas Gomez, N. 2013. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 57:1957-1960.
  129. Castanheira, M., Pereira, A.S., Nicoletti, A.G., Pignatari, A.C., Barth, A.L., and Gales, A.C. 2007. First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1527-1529.
  130. Bado, I., Cordeiro, N.F., Robino, L., Garcia-Fulgueiras, V., Seija, V., Bazet, C., Gutkind, G., Ayala, J.A., and Vignoli, R. 2010. Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum beta-lactamases and *qnr* alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *Int J Antimicrob Agents* 36:453-458.
  131. Albornoz, E., Lucero, C., Romero, G., Rapoport, M., Guerriero, L., Andres P. WHONET-Argentina Group1, Galas, M., Corso, A., and A., P.

2014. Analysis of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of the tribe *Proteeae* from Argentina: First report of *qnrD* in the Americas. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2:322-326.
132. Seija, V., Medina Presentado, J.C., Bado, I., Papa Ezdra, R., Batista, N., Gutierrez, C., Guirado, M., Vidal, M., Nin, M., and Vignoli, R. 2015. Sepsis caused by New Delhi metallo-beta-lactamase (blaNDM-1) and *qnrD*-producing *Morganella morganii*, treated successfully with fosfomicin and meropenem: case report and literature review. *Int J Infect Dis* 30:20-26.
133. Fonseca, E.L., Dos Santos Freitas, F., Vieira, V.V., and Vicente, A.C. 2008. New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg Infect Dis* 14:1129-1131.
134. Neonakis, I., Gikas, A., Scoulica, E., Manios, A., Georgiladakis, A., and Tselentis, Y. 2003. Evolution of aminoglycoside resistance phenotypes of four Gram-negative bacteria: an 8-year survey in a University Hospital in Greece. *Int J Antimicrob Agents* 22:526-531.
135. Ambrozic Avgustin, J., Keber, R., Zerjavic, K., Orazem, T., and Grabnar, M. 2007. Emergence of the quinolone resistance-mediating gene *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella* isolates collected in Slovenia between 2000 and 2005. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4171-4173.
136. Cordeiro, N.F., Robino, L., Medina, J., Seija, V., Bado, I., Garcia, V., Berro, M., Pontet, J., Lopez, L., Bazet, C., et al. 2008. Ciprofloxacin-resistant enterobacteria harboring the *aac(6')-Ib-cr* variant isolated from feces of inpatients in an intensive care unit in Uruguay. *Antimicrob Agents Chemother* 52:806-807.
137. Jiang, Y., Zhou, Z., Qian, Y., Wei, Z., Yu, Y., Hu, S., and Li, L. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother* 61:1003-1006.
138. Lin, C.J., Siu, L.K., Ma, L., Chang, Y.T., and Lu, P.L. 2012. Molecular epidemiology of ciprofloxacin-resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Microb Drug Resist* 18:52-58.
139. Gomez, S., Rapoport, M., Togneri, A., Viegas-Caetano, J., Faccone, D., Corso, A., Petroni, A., and Pasteran, F. 2011. Emergence of metallo-beta-lactamases in Enterobacteriaceae from Argentina. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69:94-97.
140. de Toro, M., Rodriguez, I., Rojo-Bezares, B., Helmuth, R., Torres, C., Guerra, B., and Saenz, Y. 2013. pMdT1, a small ColE1-like plasmid mobilizing a new variant of the *aac(6')-Ib-cr* gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother* 68:1277-1280.
141. Cremet, L., Caroff, N., Dauvergne, S., Reynaud, A., Lepelletier, D., and Corvec, S. 2011. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL Enterobacteriaceae clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. *Pathol Biol (Paris)* 59:151-156.
142. Silva-Sanchez, J., Barrios, H., Reyna-Flores, F., Bello-Diaz, M., Sanchez-Perez, A., Rojas, T., and Garza-Ramos, U. 2011. Prevalence and

- characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in Mexico. *Microb Drug Resist* 17:497-505.
143. Ruiz, S.J., Montealegre, M.C., Ruiz-Garbajosa, P., Correa, A., Briceno, D.F., Martinez, E., Rosso, F., Munoz, M., Quinn, J.P., Canton, R., et al. 2011. First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America. *J Clin Microbiol* 49:1993-1996.
  144. Frasson, I., Cavallaro, A., Bergo, C., Richter, S.N., and Palu, G. 2011. Prevalence of aac(6')-Ib-cr plasmid-mediated and chromosome-encoded fluoroquinolone resistance in Enterobacteriaceae in Italy. *Gut Pathog* 3:12.
  145. Elgorriaga-Islas, E., Guggiana-Nilo, P., Dominguez-Yevenes, M., Gonzalez-Rocha, G., Mella-Montecinos, S., Labarca-Labarca, J., Garcia-Canete, P., and Bello-Toledo, H. 2012. [Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinant aac(6')-Ib-cr among ESBL producing enterobacteria isolates from Chilean hospitals]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30:466-468.
  146. Machado, E., Coque, T.M., Canton, R., Baquero, F., Sousa, J.C., and Peixe, L. 2006. Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing Enterobacteriaceae strains containing the aac(6')-Ib-cr gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 50:3220-3221.
  147. Perilli, M., Forcella, C., Celenza, G., Frascaria, P., Segatore, B., Pellegrini, C., and Amicosante, G. 2009. Evidence for qnrB1 and aac(6')-Ib-cr in CTX-M-15-producing uropathogenic Enterobacteriaceae in an Italian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 64:90-93.
  148. Calhau, V., Ribeiro, G., Mendonca, N., and Da Silva, G.J. 2013. Prevalent combination of virulence and plasmidic-encoded resistance in ST 131 *Escherichia coli* strains. *Virulence* 4:726-729.
  149. Clermont, O., Lavollay, M., Vimont, S., Deschamps, C., Forestier, C., Branger, C., Denamur, E., and Arlet, G. 2008. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother* 61:1024-1028.
  150. Mshana, S.E., Imirzalioglu, C., Hossain, H., Hain, T., Domann, E., and Chakraborty, T. 2009. Conjugative IncFI plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL producing isolates at a University hospital in Germany. *BMC Infect Dis* 9:97.
  151. Perichon, B., Courvalin, P., and Galimand, M. 2007. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2464-2469.
  152. Rocha-Gracia, R., Ruiz, E., Romero-Romero, S., Lozano-Zarain, P., Somalo, S., Palacios-Hernandez, J.M., Caballero-Torres, P., and Torres, C. 2010. Detection of the plasmid-borne quinolone resistance determinant *qepA1* in a CTX-M-15-producing *Escherichia coli* strain from Mexico. *J Antimicrob Chemother* 65:169-171.
  153. Liu, J.H., Deng, Y.T., Zeng, Z.L., Gao, J.H., Chen, L., Arakawa, Y., and Chen, Z.L. 2008. Coprevalence of plasmid-mediated quinolone resistance

- determinants QepA, Qnr, and AAC(6')-Ib-cr among 16S rRNA methylase RmtB-producing *Escherichia coli* isolates from pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2992-2993.
154. Yamane, K., Wachino, J., Suzuki, S., and Arakawa, Y. 2008. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1564-1566.
  155. Saba, V., M., Rincón, C., G., Villarroel, G., M., Aguilar, V., Pimente, T., Álvarez, L., Balderrama, N., Gutkind, G., Radice, M., and Di Conza, J. 2014. Plasmid Mediated Quinolone Efflux Pumps in *Escherichia coli* Resistant to Third Generation Cephalosporins(TGC) in Cochabamba, Bolivia. In *54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Washinton, D.C: ICAAC.
  156. Everett, M.J., Jin, Y.F., Ricci, V., and Piddock, L.J. 1996. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 40:2380-2386.
  157. Tian, G.B., Rivera, J.I., Park, Y.S., Johnson, L.E., Hingwe, A., Adams-Haduch, J.M., and Doi, Y. 2011. Sequence type ST405 *Escherichia coli* isolate producing QepA1, CTX-M-15, and RmtB from Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother* 55:3966-3967.
  158. Park, Y.J., Yu, J.K., Kim, S.I., Lee, K., and Arakawa, Y. 2009. Accumulation of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes, *qepA* and *qnrS1*, in *Enterobacter aerogenes* co-producing RmtB and class A beta-lactamase LAP-1. *Ann Clin Lab Sci* 39:55-59.
  159. Deng, Y., He, L., Chen, S., Zheng, H., Zeng, Z., Liu, Y., Sun, Y., Ma, J., Chen, Z., and Liu, J.H. 2011. F33:A-B- and F2:A-B- plasmids mediate dissemination of *rmtB-bla<sub>CTX-M-9</sub>* group genes and *rmtB-qepA* in *Enterobacteriaceae* isolates from pets in China. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4926-4929.
  160. Chen, L., Chen, Z.L., Liu, J.H., Zeng, Z.L., Ma, J.Y., and Jiang, H.X. 2007. Emergence of RmtB methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China. *J Antimicrob Chemother* 59:880-885.
  161. Xu, X., Wu, S., Ye, X., Liu, Y., Shi, W., Zhang, Y., and Wang, M. 2007. Prevalence and expression of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnrA1*. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4105-4110.
  162. Billard-Pomares, T., Tenailon, O., Le Nagard, H., Rouy, Z., Cruveiller, S., Medigue, C., Arlet, G., Denamur, E., and Branger, C. 2011. Complete nucleotide sequence of plasmid pTN48, encoding the CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase from an *Escherichia coli* O102-ST405 strain. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1270-1273.
  163. Chen, C.M., Ke, S.C., Li, C.R., Chiou, C.S., and Chang, C.C. 2014. Prolonged clonal spreading and dynamic changes in antimicrobial resistance of *Escherichia coli* ST68 among patients who stayed in a respiratory care ward. *J Med Microbiol* 63:1531-1541.
  164. Johnson, T.J., and Nolan, L.K. 2009. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:750-774.

165. Chen, X., He, L., Li, Y., Zeng, Z., Deng, Y., Liu, Y., and Liu, J.H. 2014. Complete sequence of a F2:A-B- plasmid pHN3A11 carrying *rmtB* and *qepA*, and its dissemination in China. *Vet Microbiol*.
166. Zhao, J., Chen, Z., Chen, S., Deng, Y., Liu, Y., Tian, W., Huang, X., Wu, C., Sun, Y., Zeng, Z., et al. 2010. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4219-4224.
167. Yuan, J., Xu, X., Guo, Q., Zhao, X., Ye, X., Guo, Y., and Wang, M. 2012. Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 67:1655-1659.
168. Wong, M.H., Chan, E.W., Liu, L.Z., and Chen, S. 2014. PMQR genes *oqxAB* and *aac(6')-Ib-cr* accelerate the development of fluoroquinolone resistance in *Salmonella typhimurium*. *Front Microbiol* 5:521.
169. Veleba, M., De Majumdar, S., Hornsey, M., Woodford, N., and Schneiders, T. 2013. Genetic characterization of tigecycline resistance in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Antimicrob Chemother* 68:1011-1018.
170. Taherpour, A., and Hashemi, A. 2013. Detection of OqxAB efflux pumps, OmpK35 and OmpK36 porins in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. *Hippokratia* 17:355-358.
171. Rodriguez-Martinez, J.M., Diaz de Alba, P., Briales, A., Machuca, J., Lossa, M., Fernandez-Cuenca, F., Rodriguez Bano, J., Martinez-Martinez, L., and Pascual, A. 2013. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 68:68-73.
172. Kim, H.B., Wang, M., Park, C.H., Kim, E.C., Jacoby, G.A., and Hooper, D.C. 2009. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:3582-3584.
173. Chen, X., Zhang, W., Pan, W., Yin, J., Pan, Z., Gao, S., and Jiao, X. 2012. Prevalence of *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrob Agents Chemother* 56:3423-3427.
174. Ferjani, S., Saidani, M., Amine, F.S., and Boutiba Ben Boubaker, I. 2014. Prevalence and Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in a Tunisian Hospital. *Microb Drug Resist*.
175. Albornoz, E., Romero, G., Corso, A., and Petroni, A. 2014. First Report of *oqxAB* in Clinical *Escherichia coli* from Argentina In *54th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Washington, D.C.
176. Liu, B.T., Li, L., Fang, L.X., Sun, J., Liao, X.P., Yang, Q.E., Huang, T., and Liu, Y.H. 2014. Characterization of Plasmids Carrying *oqxAB* in bla-Negative *Escherichia coli* Isolates from Food-Producing Animals. *Microb Drug Resist*.
177. Liu, B.T., Yang, Q.E., Li, L., Sun, J., Liao, X.P., Fang, L.X., Yang, S.S., Deng, H., and Liu, Y.H. 2013. Dissemination and characterization of

- plasmids carrying *oqxAB-bla*<sub>CTX-M</sub> genes in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals. *PLoS One* 8:e73947.
178. Tamang, M.D., Gurung, M., Kang, M.S., Nam, H.M., Moon, D.C., Jang, G.C., Jung, S.C., Park, Y.H., and Lim, S.K. 2014. Characterization of plasmids encoding CTX-M beta-lactamase and their addiction systems in *Escherichia coli* isolates from animals. *Vet Microbiol* 174:456-462.
  179. Zong, Z., Yu, R., Wang, X., and Lu, X. 2011. *bla*<sub>CTX-M-65</sub> is carried by a Tn1722-like element on an IncN conjugative plasmid of ST131 *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 60:435-441.
  180. Sidjabat, H.E., Paterson, D.L., Adams-Haduch, J.M., Ewan, L., Pasculle, A.W., Muto, C.A., Tian, G.B., and Doi, Y. 2009. Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates at a tertiary medical center in western Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4733-4739.
  181. He, L., Partridge, S.R., Yang, X., Hou, J., Deng, Y., Yao, Q., Zeng, Z., Chen, Z., and Liu, J.H. 2013. Complete nucleotide sequence of pHN7A8, an F33:A-B- type epidemic plasmid carrying *bla*<sub>CTX-M-65</sub>, *fosA3* and *rmtB* from China. *J Antimicrob Chemother* 68:46-50.
  182. Norman, A., Hansen, L.H., She, Q., and Sorensen, S.J. 2008. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid* 60:59-74.
  183. Diestra, K., Coque, T.M., Miro, E., Oteo, J., Nicolau, C.J., Campos, J., Moya, B., Curiao, T., Perez-Vazquez, M., Canton, R., et al. 2008. [Characterization and molecular epidemiology of ESBL in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 11 Spanish hospitals (2004)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 26:404-410.
  184. Jouini, A., Slama, K.B., Klibi, N., Sallem, R.B., Estepa, V., Vinue, L., Saenz, Y., Ruiz-Larrea, F., Boudabous, A., and Torres, C. 2013. Lineages and virulence gene content among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains of food origin in Tunisia. *J Food Prot* 76:323-327.
  185. Nebbia, P., Tramuta, C., Odore, R., Nucera, D., Zanatta, R., and Robino, P. 2014. Genetic and phenotypic characterisation of *Escherichia coli* producing cefotaximase-type extended-spectrum beta-lactamases: first evidence of the ST131 clone in cats with urinary infections in Italy. *J Feline Med Surg* 16:966-971.
  186. Ding, Y., Tang, X., Lu, P., Wu, B., Xu, Z., Liu, W., Zhang, R., Bei, W., Chen, H., and Tan, C. 2012. Clonal analysis and virulent traits of pathogenic extraintestinal *Escherichia coli* isolates from swine in China. *BMC Vet Res* 8:140.
  187. Pitart, C., Sole, M., Roca, I., Roman, A., Moreno, A., Vila, J., and Marco, F. 2014. Molecular characterization of *bla*<sub>NDM-5</sub> carried in an IncFII plasmid in *Escherichia coli* from a non-traveller patient in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*.
  188. Porres-Osante, N., Azcona-Gutierrez, J.M., Rojo-Bezarez, B., Undabeitia, E., Torres, C., and Saenz, Y. 2014. Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. *J Antimicrob Chemother* 69:1792-1795.

189. Blaak, H., Hamidjaja, R.A., van Hoek, A.H., de Heer, L., de Roda Husman, A.M., and Schets, F.M. 2014. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* on flies at poultry farms. *Appl Environ Microbiol* 80:239-246.
190. Jin Choi, M., Suk Kyung, L., Suk Chan, J., and Kwan S, K. 2014. Comparisons of CTX-M-Producing *Escherichia coli* Isolates from Humans and Animals in South Korea *Journal of Bacteriology and Virology* 44:44-51.

# Anexo I: Protocolos

---





**Protocolo de Extracción de Plásmidos de Alto Peso Molecular.**  
**KADU y LIU (75)**

1. sembrar el aislamiento en 5 ml. de caldo LB, incubar a 37°C durante toda la noche (ON).
2. centrifugar, 3 ml de un cultivo en caldo LB, a 13.000 RPM en microcentrífuga (Micro Centaur, SANYO), durante 2 minutos.
2. descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de *buffer* E.
3. agregar a la suspensión bacteriana 2 ml de solución de lisis suplementada con 20 µg de RNAsa mezclar suavemente por inversión.
4. Incubar a 58°C durante 20 minutos.
5. Añadir 1 ml de mezcla de fenol-cloroformo-isoamilico (24:24:1). Mezclar utilizando el vortex.
6. centrifugar 15 minutos a 13.000 RPM en la microcentrífuga.
7. transferir la fase acuosa, que contiene el ADN plasmídico, colocando 400 µl en tubos eppendorf.
8. añadir 40 µl de NaCl 5M (concentración final: 0,3-0,5 M) y 800 µl (2 volúmenes) de etanol 96%.
9. incubar ON a -20 °C para que precipite el ADN plasmídico.
10. centrifugar a 13.000 RPM en microcentrífuga, durante 15 minutos.
11. lavar con 1 ml de etanol 70%, no mezclar ni remover el pellet, y volver a centrifugar como en el paso 10.
12. Extraer el alcohol y dejar secar el pellet a T° ambiente.
13. Resuspender en 50-100 µl de agua MilliQ estéril.

Sugerencias:

- Conservar la extracción de plásmidos a 4°C, en esta condición se preservan durante 1 años
- Cada vez que se utilice la extracción se recomienda el uso de tips estériles para evitar la contaminación.

### **Protocolo de Preparación de Conos de agarosa y Desalado de Plásmidos**

1. preparar los conos para desalar, mezclando 0,9 gr. de glucosa, 0,5gr de agarosa y 50 ml de agua.
2. suavemente disolver en microondas, hasta que se encuentre totalmente líquida y transparente
3. mantener la solución a 50°C
4. colocar 800µl de la solución preparada en un tubo eppendorff de 1,5 ml, realizar este proceso por cada plásmido que se necesite desalar.
5. colocar un tubo de 0,5 ml. dentro del tubo de 1,5 que contiene la solución de agarosa y glucosa.
6. esperar que la glucosa solidifique y sacar suavemente por rotación los tubos de 0,5ml, obteniendo de esta manera una cavidad cóncava dentro de la agarosa.
7. agregar la cantidad de plásmido que se desea desalar en la cavidad cóncava de la agarosa, dejar en hielo durante 1 hora.
8. transferir la solución con el plásmido a un tubo eppendorff, marcar adecuadamente y guardar a 4 grados hasta el momento de su uso
9. desechar los conos de agarosa utilizados.

### **Protocolo de obtención Células Electrocompetentes**

1. sembrar en 5 ml de caldo LB. La cepa receptora en el proceso de electroparación.
2. realizar una dilución 1 /100 en LB (3 ml de cultivo del paso 1 en 300ml de LB. Incubar a 37°C en agitación hasta una densidad óptica ( $DO_{\lambda 550}$ ) de 0,7.
3. centrifugar a 4°C, durante 5 min. A 6500 rpm. ( centrifuga Sorvall)
4. realizar dos lavados com agua milliq fría y estéril, resuspender suavemente entre cada lavado, con pipeta de vidrio, para evitar que se rompan lãs células.
5. hacer un lavado con glicerol AL 10% frío y estéril, volver a centrifugar como en el paso tres.
6. resuspender el pellet total con 600 µl de glicerol al 10% y alicuotar (40 µl) en eppendorf para conservar a (-70°C).

### **Protocolo de Lavado de Cubetas para Electroporación**

1. Lavar tres veces con agua milliq estéril.
2. lavar con 1ml de etanol calidad analítica
3. llenar nuevamente cada cubeta con Etanol calidad analítica y dejar con el mismo.
4. Lavar con agua milliq estéril justo antes de su uso.

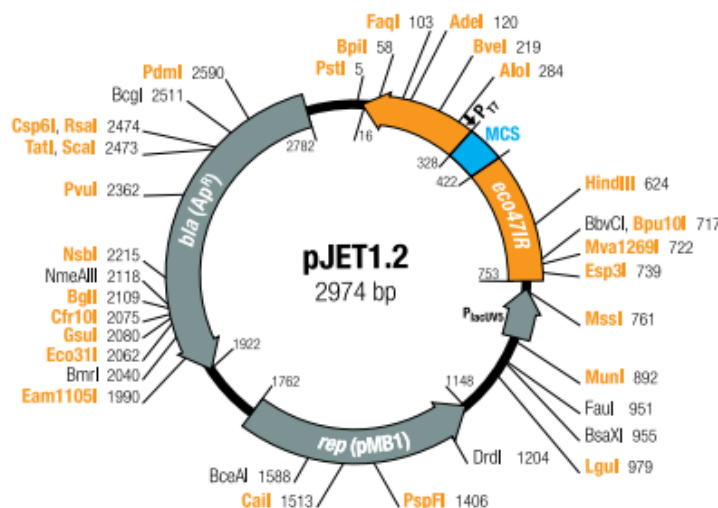
### Protocolo de clonación pJET 1.2 (Thermo Scientific)

1. amplificar el fragmento de interés con los *primers* específicos para el mismo y purificarlo.
2. realizar la mix siguiendo el instructivo del kit:

*buffer* de reacción 2x .....10µl  
 Producto de PCR.....1 µl  
 Agua .....6 µl  
 Enz. DNA Blunting ..... 1 µl  
 Volumen total ..... 18 µl

3. mezclar suavemente con el vortex y centrifugar de 3 a 5 segundos.
4. Incubar a 70°C durante 5 minutos, colocar inmediatamente en hielo.
5. Adicionar a la mezcla anterior 1 µl del vector (0,05pmol) y 1 µl de T4 DNA ligasa, pasa así completar un volumen total de 20 µl.
6. mezclar suavemente en vortex, centrifugar de 3 a 5 segundos e incubar a 22°C durante 5 min.
7. Utilizar 5 µl para la transformación.
8. La selección de transformantes se realiza con ampicilina 100 mg/L.

**Figura 51: Mapa del vector de clonación pJET 1.2 y *primers* utilizados para la secuenciación**



pJET1.2 FW.	5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'
pJET1.2 RV.	5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

Tomado y adaptado de <http://www.thermoscientificbio.com/molecular-cloning/clonjet-PCR-cloning-kit/>

## **Protocolo de Transformación Química con Cloruro de Calcio.**

### **Obtención de células competentes**

1. preparar un cultivo O/N de *E.coli* TOP10 o DH5 $\alpha$
2. diluir 1/100 en medio BHI (4ml de medio+ 50 $\mu$ l del cultivo O/N)
3. incubar en agitación a 37°C, preferiblemente en botella hasta alcanzar una DO<sub>550</sub>: 0-4-0,6
4. colocar 1m en tres tubos diferentes, un tubo como control negativo, un tubo para agregar el plásmido que se desea transformar y un tubo como control positivo para transformar con pK19.
5. centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
6. descartar el sobrenadante y resuspender en 500 $\mu$ l de ST1
7. centrifugar 5 min a 5000 rpm a temperatura ambiente.
8. descartar el sobrenadante, resuspender en 500  $\mu$ l de ST2
9. incubar en hielo al menos 15 min a 0°C.
10. centrifugar 5 minutos a 5000 rpm a temperatura ambiente.
11. descartar el sobrenadante
12. resuspender a 100  $\mu$ l de ST2

### **Transformación de competentes**

13. agregar de 3 a 5  $\mu$ l de plásmido
14. incubar durante 1 hora en hielo
15. realizar choque térmico, colocando los tubos a 42°C durante 45 segundos.
16. agregar 1 ml de medio TSB e incubar 1 hora a 37°C
17. centrifugar 5 minutos a 4200 rpm. A temperatura ambiente y eliminar 1 ml del sobrenadante.
18. resuspender las células en los 100  $\mu$ l restantes.
19. mezclar y plaquear el volumen total en los medios de selección adecuado, incubar a 37°C durante 16 a 20 horas.

## **Anexo II: *Buffery* Soluciones**

---



### Reactivos Utilizados en extracción de plásmidos KADO y LIU

➤ Solución de Lisis

3% de SDS

50 mM de TRIS

pH 12,6: llevar a pH con NaOH 2N (hay que añadir 1,5 ml aprox.), Volumen final: 100 ml (llevar a volumen con agua destilada) ,Esterilización por filtración (membrana con poros de 0,2 µm)

➤ *Buffer E*

- 40 mM TRIS-acetato

- 2 mM de sodio-EDTA

pH 7,9: Llevar a pH con ácido acético glacial, Esterilización por calor húmedo en autoclave. (El *buffer E* es en composición igual al *buffer TAE*, lo que varía es el pH. En su reemplazo se puede utilizar *buffer TAE 1X estéril*)

➤ Fenol-cloroformo-isoámilico (24:24:1).

➤ NaCl 5M

➤ Etanol al 96% calidad analítica.

### Reactivos Utilizados en Electroforesis de Campo Pulsado -PFGE)

➤ *Buffer PIV* pH 7.6

1M TRIS pH 7.6..... 100 ml de una Sn. 5 M de TRIS 5 M, pH8.0

1 M NaCl .....29,2 gr NaCl

Agua destilada hasta completar 500 ml.

Esterilizar en autoclave.

➤ *Buffer de Lisis* pH 7.6

1M TRIS pH 7.6..... 100 ml de TRIS 5M pH 8.0

1 M NaCl..... 29,2 gr NaCl

100 mM EDTA pH 7.6..... 100 ml de EDTA. 0,5 M pH 8.0

0,2% Deoxicolato-Na.....1 gr Deoxicolato-Na

0,5% Laurilsarcosina-Na . .....2,5 gr Laurilsarcosina-Na

0,5% Brij-58 .....2,5 gr Brij-58



Agua destilada hasta 500 ml.

Esterilizar en autoclave

Al momento de uso, agregar 1 mg/ml de Lisozima pH 7.6 y 50 µg/ml Ribonucleasa A.

➤ **Buffer ES:**

Pesar el EDTA y disolver en 400 ml. de agua destilada. Ajustar a pH 9.0 agregando grageas de NaOH. Agregar 5 gr de laurilsarcosina-Na. Ajustar a volumen a 500 ml con agua destilada.

Esterilizar en autoclave

0,4M EDTA..... 74,45 gr EDTA

1% laurilsarcosinato-Na..... 5 gr laurilsarcosinato-Na

*Buffer ES-P:* ( *buffer ES+* Proteinasa K)

Preparar en el momento de su uso, según la cantidad de *plugs* a realizar.

Solución Stock	1 plug	10 plugs	15 plugs	20 plugs	Concentración Final
<i>Buffer ES</i>	1 ml	10 ml	15 ml	20 ml	<i>Buffer 1 X</i>
Proteinasa K	0,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 ml	0,5 mg/ml

➤ *Buffer TE 1X* pH 7.5

5 mM TRIS.....500 µl de TRIS 5M

5 mM EDTA.....5 ml de EDTA 5 M

pH 7,5, ajustar a 500 ml con agua destilada.

Esterilizar en autoclave.

➤ *Buffer TBE 10X*

TRIS base 0,89 M.....108 gr (pH 8.0)

Borato 0,089 M.....55 gr

2.5 mM EDTA disódico..... 5 ml EDTA 0,5M

Ajustar a 1000 ml. con agua destilada

Esterilizar en autoclave.

➤ Solución Stock de TRIS 5 M pH 7.6

Pesar 181,2 gr de TRIS y agregar 200 ml de agua destilada. Ajustar a pH 8.0 por el agregado de HCl concentrado. Ajustar a 300 ml.

➤ Solución Stock de EDTA 0,5 M pH 7.6

Pesar 186,1 gr de EDTA (sal disodica, PM: 372,24), agregar 800 ml agua destilada. Mezclar y ajustar a pH 8.0 con aproximadamente 20 gr de grageas de NaOH. Ajustar el volumen a 1L con agua destilada. Esterilizar en autoclave.

### Reactivos Utilizados en Transformación química.

➤ Solución ST1 (Sal de transformación 1)

MOPS..... 10mM

KCl ..... 10mM

Ajustar a pH 7 con NaOH 10M

Esterilizar por filtración y conservar en frío.

➤ Solución ST2 (Sal de transformación 2)

MOPS..... 10mM

KCl ..... 10mM

CaCl<sub>2</sub>.....50μM

Ajustar pH a 6,5 con NaOH 10M

Esterilizar por filtración y conservar en frío.

Manejar con precaución el CaCl<sub>2</sub> ya que causa irritación en mucosas.

### Reactivos a utilizar en la transferencia de geles

➤ HCl 0,2N para 200 ml

3.33 ml de HCl, completar a 200 ml con agua.

➤ *Buffer* de desnaturalización 0,4N NaOH, 3M NaCl

Para 200 ml, pesar 35,064 gr. de NaCl y 3,2 gr. de NaOH, completar con agua a 200ml.

➤ *Buffer* de transferencia 8mM NaOH, 3M NaCl:

Pesar 70,128gr. de NaCl y 0,128 gr. de NaOH completar con agua destilada hasta un volumen de 400ml.

➤ *Buffer* Fosfato 0,25M pH 7.0:

Agregar de la solución madre de fosfato A, 19,6 ml y de la solución B 60,8 ml. completar con agua destilada hasta 100 ml. las soluciones madres ya tiene el pH ajustado así que no hay que ajustarlo.

**Reactivos a utilizar en la Hibridación utilizando el Kit Dlg High Prime**

- SSC 20 x  
3M NaCl  
0,3M Na<sub>3</sub> citrato.2H<sub>2</sub>O
  
- *Buffer washing*  
0,1M ácido maleico  
0,15M NaCl pH 7,5  
0,3% V/V Tween 20
  
- *Buffer de ácido maleico*  
0,1M de ácido maleico  
0,15M NaCl  
Ajustar com perlas de NaOH a pH 7,5.
  
- *Buffer de detección*  
0,1 Tris Hcl  
0,1 NaCl
  
- SSC2X + 0,1%SDS  
10 ml SSC  
1 ml SDS  
89 ml H<sub>2</sub>O
  
- SSC 0,5X +0,1%SDS  
2,5 ml SSC  
1 ml SDS  
96,5 ml H<sub>2</sub>O

## **Anexo II: *Primers***

---



**Primers, adicionales utilizados**

<i>Primers</i>	Secuencia 5'-3'	Tamaño esperado (pb)	Ta	Gen amplificado
TEM F TEM R	ATGRRMYTMAACATTTYCGTGT TTACCAAKGCTTAATCAGTGAGG	800	55-58	<i>bla-TEM</i>
SHVF SHVR	TCGGGCCGCGTAGGCATGAT AGGGCGACAACCTCCGCG	625	58	<i>bla-SHV</i>
CTX-M-1CF CTX-M-1 CR	ATGGTTAAAAAATCACTGC GGTGACGATTTTAGCCGC	864	55	<i>bla-CT-X-M</i> Grupo 1
BLA 1 BLA 2	TTAATGATGACTCAGAGCATT GATACCTCGCTCCATTTATTGC	910	55	<i>bla-CTX-M</i> Grupo 2
BLA CTX-M- 9 CF BLA CT-X-M- 9 CR	ATGGTGACAAAGAGAGTGC TCACAGCCCTTCGGCGATG	876	55	<i>bla-CTX-M</i> Grupo 9
MOXMF MOXFR	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520	Multiplex 60	<i>bla-AmpC</i>
CITF CITR	TGGCCAGAAGTACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462		
DHAF DHAR	AACTTTCACAGTTGTGCTGGGT CCGTACGCATACTGGCTTTGC	405		
AACMF AACMR	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA TCCGCCGCAATCATCCCTTGC	346		
EBCMF EBCMR	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302		
FOXMF FOXMR	AACATGGGGTATCAGGGAGATG CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190		
Oxa-1 F Oxa-1 R	CCATTATTTGAAGGAACTGA TAGTGTGTTTAGAATGGTGA	850		
I3F I5R	GCGTTCGGTCAAGGTTCTGG ACCGCCAACCTTTCAGCACAT	927	52	<i>intI1</i>
5CS 3CS	GGCATCCAAGCAGCAAGC AAGCAGACTTGACCTGAT	Variable	52	variable
INT2F INT2R	TTATTGCTGGGATTAGGC ACGGCTACCCTCTGTTATC	233	52	<i>intI2</i>



## **Anexo IV: Resultados complementarios**

---





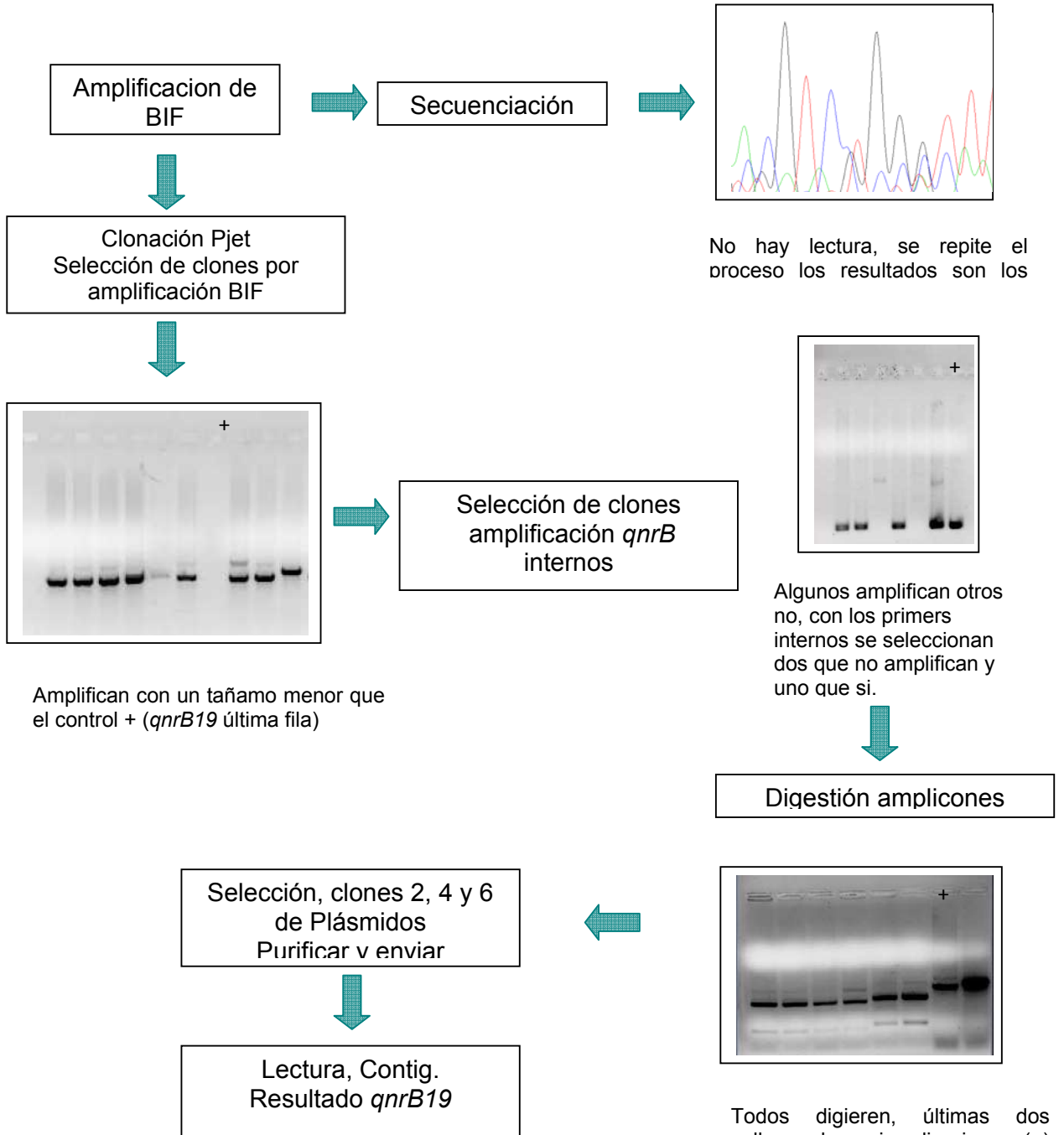
**Secuencias del gen *aac(6')-Ib-cr* de los aislamientos de Argentina**

<b>KJ716225.1</b>	264	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>C1</b>	129	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>CL4</b>	130	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>CL5</b>	142	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>CL6</b>	142	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>CL7</b>	129	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>CL9</b>	143	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>CM1</b>	131	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>CM2</b>	131	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>CM4</b>	142	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>CV2</b>	131	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>I3</b>	130	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>I4</b>	130	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>L4</b>	131	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>M1</b>	130	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>SM4</b>	142	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>SM5</b>	131	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>SM7</b>	142	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>T1</b>	130	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>T2</b>	128	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>T3</b>	142	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>T8</b>	129	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG
<b>R1</b>	130	GTATGCCCAGTCGTACGTTGCTCTTGGAAGCGGGGACGGACGGTGGGAAGAAGAAACCGATCCAGG

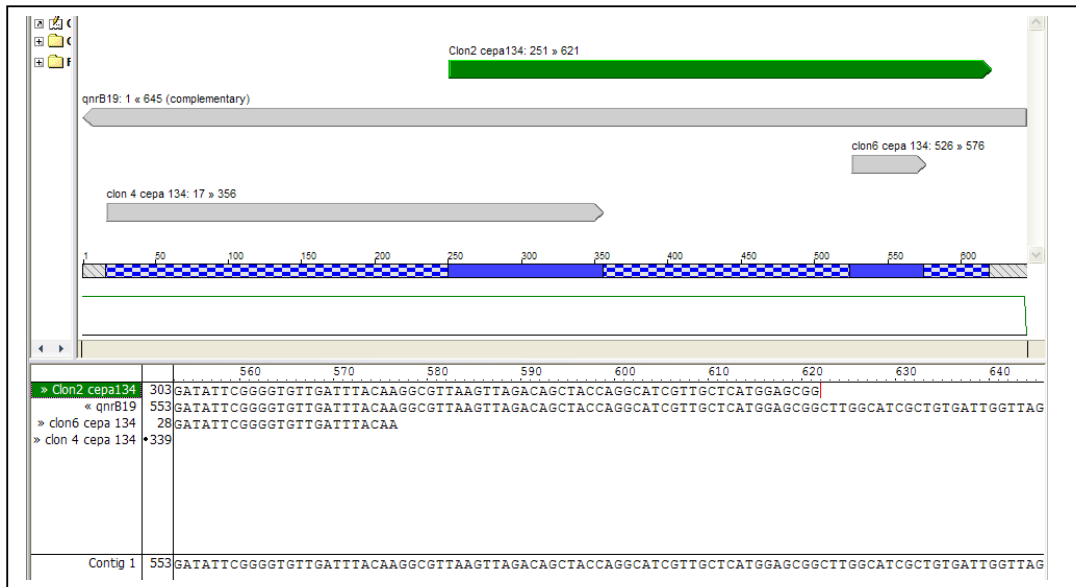
Kp: *Klebsiella pneumoniae* con *aac(6')Ib-cr* GenBank KJ716225.1.

En la figura, se alinean las secuencias de la variante de la enzima modificador de aminoglicósidos, frente a la secuencia de Genbank de la enzima (KJ716225), la mutación silenciosa se da en la variante *aac(6')-Ib-cr* en la posición 306 de TGG a AGG a CGG, que traduce a T306A, la mayoría proporción de los aislamientos de Argentina mantienen la variante CGG.

**Determinación del alelo de *qnrB* en *Serratia* sp (134 Perú).**



Contig de la secuencia obtenida de cada clon obtenido del aislamiento 134 comparada con el gen *qnrB19*



Gene Bank *qnrB19* JX298079.1, Clon 2: fragmento de 371 bases; Clon 4; fragmento de 341; Clon6 fragmento de 51 bases.

**Alelo de *qepA* aislamiento C27**  
**alineamiento con *qepA1* y *qepA2***


Qep A C27

Secuencia consenso

TAGATCGTCAGCAGCACCGCCGCCAGCGACAGCAGCACGCTGGCCAGGT  
 CCAGGTGCCCCGCGTCCGGATCACGATACTCGGGCAGGAAGCGAGGGCC  
 GAGCGCCAGCGTCAGCAGCATCACCGGCACGTTGAGCCAGAACACGGCG  
 CCCCAGTGGAAAGAACTCCAGCAACACGCCGCCGACCAGCGGACCGATCG  
 CGCTGCCCAGCGAAAACGCGGCGATCCACACGCCGATGGCGAACTGGCG  
 CTGGCGCGGGTTCGTGGAACATGTTGCGGATCAGCGCCATGGTGGACGGC  
 GCGATGGTGGCGCCGGCCAGGCCGAGCAAGGCGCGCGCCGCGATCAAC  
 AGCGCGGCGGTATCGGCCAGCGCCGCGAGCACCGAGGCGAATGCGAATA  
 ACGCCGCGCCGATCAACAACAGCCGGCGCCGGCCGATGCGGTGCCCCA  
 GCGTGCCCATGGTATCAGGAAGCCGGCGACGAAGAAGCCGTAGATGT

Alineamiento con QepA1(85) y QepA2(52)

**Alignment**

 [How to print an alignment in color](#)

QEPA1	1	MSATLHDTAADRRKATRREWIGLAVVALPCLVYAMDLTIVLNALFVLSRELQPSSAQLLW	60
QEPA2	1	MSATLHDTAADRRKATRREWIGLAVVALPCLVYAMDLTIVLNALFVLSRELQPSSAQLLW	60
C27	1	-----	0
QEPA1	61	ILDYGFVAGFLITMGTLDGRIGRRRLLLIGAAIFAFASVLAALADTAALLIAARALLG	120
QEPA2	61	ILDYGFVAGFLITMGTLDGRIGRRRLLLIGAAIFAFASVLAALADTAALLIAARALLG	120
C27	1	---IYGFVAGFLITMGTLDGRIGRRRLLLIGAAIFAFASVLAALADTAALLIAARALLG	57
		*****:***.*****	
QEPA1	121	LAGATIAPSTMALIRNMFHDPQRQFAIGVWIAAFSLGSAIGPLVGGVLEFFHWGAVFW	180
QEPA2	121	LAGATIAPSTMALIRNMFHDPQRQFAIGVWIAAFSLGSAIGPLVGGVLEFFHWGAVFW	180
C27	58	LAGATIAPSTMALIRNMFHDPQRQFAIGVWIAAFSLGSAIGPLVGGVLEFFHWGAVFW	117
		*****:	
QEPA1	181	LNVPVMLLTLALGPRFLPEYRDPDAGHLDLASVLLSLAAVLLTIYGLKQLAEHGAGLASM	240
QEPA2	181	LNVPVMLLTLALGPRFLPEYRDPDAGHLDLASVLLSLAAVLLTIYGLKQLAEHGAGLASM	240
C27	118	LNVPVMLLTLALGPRFLPEYRDPDAGHLDLASVLLSLAAVLLTI-----	161
		*****	
QEPA1	241	AALLAGLAVGALFLRRQGHIAYPLLDLRLFAHAPFRAALAAYALAALAMFGVYIFMTQYL	300
QEPA2	241	AALLAGLAVGALFLRRQGHIAYPLLDLRLFAHAPFRAALAAYALAALAMFGVYIFMTQYL	300
C27	162	-----	161
QEPA1	301	QLVLGLSPLQAGLATLFWSLCFVIGSLLSPQLAARWPAARILVVGLSAAAFGFAVLGLGQ	360
QEPA2	301	QLVLGLSPLQAGLATLFWSLCFVIGSLLSPQLAARWPAARILVVGLSAAAFGFAVLGLGQ	360
C27	162	-----	161

El Punto o dos puntos debajo de los alineamientos muestran las diferencias entre los tres fragmentos de proteínas.

**Alineamiento Entornos OqxAB**



## **Anexo V: Artículos**

---