
**XIX Encuentro de Jóvenes Investigadores
14 y 15 de Octubre de 2015, Santa Fe, Argentina
TIPIFICACIÓN MOLECULAR DE PLÁSMIDOS QUE CONFIEREN RESISTENCIA A
CEFOTAXIMA.**

Marsili, Federico Francisco¹

¹Participante en actividad de Formación extracurricular en Investigación y Desarrollo para alumnos.
Laboratorio de Microbiología General. Estudiante de Lic. En Biotecnología – Universidad Nacional del Litoral –
Ciudad Universitaria, Ruta Nacional N° 168, Km 472, CP300, Santa Fe, Argentina.

Área temática: Ciencias Biológicas

Sub-área: Bioquímica

Grupo: X

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos β -lactámicos constituyen la principal forma de tratamiento contra las infecciones bacterianas. Si bien su aplicación en clínica ha sido uno de los avances más importantes en materia de salud, ni bien comenzaron a utilizarse, surgieron los primeros aislamientos bacterianos resistentes a ellas. En los últimos años se ha registrado un aumento continuo en la proporción de aislamientos resistentes a cefalosporinas de tercera generación (C3G), y otros antibióticos β -lactámicos (Cejas y col., 2012; Sennati y col., 2012). En la ciudad de Santa Fe, existen pocos estudios realizados en el área que contribuyan a describir la epidemiología local de la resistencia a C3G en enterobacterias. La resistencia a C3G se asocia, a menudo, con la presencia de genes que codifican para BLEE (β -lactamasas de espectro extendido) (Canton y col., 2012), AmpC y carbapenemasas. Con frecuencia, estos mecanismos se hallan localizados en plásmidos. Es importante poder vislumbrar la capacidad de diseminación característica de ciertos plásmidos (conjugativos o movilizables), ya que pueden desplazarse también entre células de diferentes especies, a través del proceso de conjugación (transferencia horizontal) (Carattoli, 2009). Se utilizan dos herramientas de gran relevancia en la clasificación de estos elementos de diseminación: los grupos de incompatibilidad (GI) y los sistemas toxina-antitoxina (STA). Los GI clasifican los plásmidos según su capacidad de coexistir en una misma célula en forma estable; bajo este criterio, se define a la incompatibilidad como la imposibilidad de dos plásmidos relacionados, de ser propagados en la misma línea celular (Carattoli y col., 2005). Los STA constituyen sistemas de adicción, es decir, son pequeños módulos genéticos implicados en el mantenimiento de los plásmidos en la descendencia. La adicción yace en la estabilidad diferencial de los dos componentes, siendo la antitoxina menos estable que la toxina correspondiente. Las células hijas que no posean una copia del plásmido, serán eliminadas bajo la acción de la toxina remanente (Leplae y col., 2011).

OBJETIVOS

Generales

- Caracterizar los plásmidos portadores de los genes de resistencia a C3G (BLEE y AmpC), de acuerdo a su movilidad, al GI y al STA.

Proyecto UNL, CAI + D/2011. Director: Dr. José Alejandro Di Conza

Director de la Pasantía: Dr. José Alejandro Di Conza, Asistente: Lic. Martín Marchisio.

Específicos.

- Determinar fenotípicamente y genotípicamente el mecanismo implicado en la resistencia a C3G y evaluar los GI y los STA presentes en la enterobacterias estudiadas.
- Realizar ensayos de conjugación.
- Analizar el perfil de sensibilidad a antibióticos en los transconjugantes obtenidos y determinar los GI y STA transferidos.

METODOLOGÍA

Se recuperaron todos los aislamientos con resistencia a C3G de 4 instituciones de la ciudad de Santa Fe, durante dos meses no consecutivos de los años 2012 y 2013 (n= 60). Se seleccionaron todos los aislamientos de enterobacterias con resistencia disociada a C3G, todas resistentes a cefotaxima (CTX) y sensibles a ceftazidima (CAZ) (n= 15). Utilizando pruebas bioquímicas y fisiológicas convencionales se verificó la identidad bacteriana reportada por las instituciones de salud remitentes. Mediante PCR se caracterizó el mecanismo de resistencia a C3G en los aislamientos de enterobacterias obtenidos. Se evaluó la presencia de genes codificantes de las BLEE prevalentes en nuestro país: las CTX-M de los grupos 1, 2, 9 y 8/25 y PER-2. Mediante multiplex PCR se analizaron los genes que codifican para las AmpC plasmídicas: *bla*_{CMY}, *bla*_{DHA}, *bla*_{AA} (Pérez-Pérez y Hanson, 2002). Como molde se empleó el ADN total obtenido por la lisis del microorganismo por calentamiento. Se evaluó la presencia de los siguientes sistemas TA: *pemKI*, *ccdAB*, *relBE*, *parDE*, *vagCD*, *hok-sok*, *pndAC* y *srnBC* (Mnif y col., 2010), usando como molde ADN plasmídico, obtenido por lisis alcalina de Birboin y Doly modificada (Taylor y Brose, 1988). A su vez, mediante *PCR-based replicon typing* (PBRT) (Carattoli y col., 2005), se identificaron los GI más relevantes descritos en plásmidos de enterobacterias. Se evaluó la relación clonal de los aislamientos mediante ERIC-PCR y REP-PCR. Los ensayos de sensibilidad a antibióticos (antibiograma y CIM) se interpretaron siguiendo los lineamientos descritos por CLSI (CLSI, 2015). Se realizaron ensayos de conjugación según el método de *mating-out* en medio sólido (Sambrook et al. 1989). Como cepas receptoras se utilizaron *Escherichia coli* TOP 10F- y *E. coli* HB101. El sistema de selección empleado fue el medio CLDE suplementado con Estreptomina (STR) 150/260 µg/mL + Ceftriaxona (CRO) 1 µg/mL. Sobre aquellos transconjugantes (TC) identificados como *E. coli* y portadores del mecanismo de resistencia esperado, se realizaron determinaciones de CIM mediante equipo automatizado (VITEK® 2 - bioMérieux SA). A los TC obtenidos se les evaluó la presencia de los GI A/C, FIA, FIB, FIC, B/O e I1, y los STA *hok-sok*, *pndAC*, *srnBC*, *ccdAB* y *relBE*.

RESULTADOS

La distribución de especies y de mecanismos de resistencia fue la siguiente: 11 *E. coli* (5 CTX-M-grupo 2, 4 CTX-M-grupo 9, 1 CTX-M-grupo 1 y 1 CMY), 3 *Proteus mirabilis* (2 CTX-M-grupo 2 y 1 CMY) y 1 *Klebsiella pneumoniae* (CTX-M-grupo 9). No se observó relación clonal entre los aislamientos de una misma especie. En la Tabla 1 se resume la distribución de GI y STA encontrados en los aislamientos de enterobacterias estudiados. Cabe destacar que todos los aislamientos presentaron al menos un GI incF (FIA, FIB, FIC o F). A partir de los resultados obtenidos en la determinación de la CIM a STR, se seleccionaron, para el ensayo de conjugación los aislamientos cuyas CIM resultaron menor o igual a 128 µg/mL (N=10).

Proyecto UNL, CAI + D/2011. Director: Dr. José Alejandro Di Conza
 Director de la Pasantía: Dr. José Alejandro Di Conza, Asistente: Lic. Martín Marchisio.

Tabla 1: Distribución de GI y STA por aislamiento.

Rótulo	Especie	GI	STA
I9	<i>P. mirabilis</i>	FIA, FIC	<i>srnBC, pndAC, relBE, ccdAB</i>
C21	<i>P. mirabilis</i>	FIC	<i>PndAC</i>
C13	<i>P. mirabilis</i>	FIA, FIC, FIB, A/C	<i>hok-sok, RelBE</i>
I26	<i>K. pneumoniae</i>	I1, FIA, B/O	<i>PndAC</i>
C17	<i>E. coli</i>	I1; FIA; FIB; A/C; F; B/O	<i>srnBC, Pnd, hok-sokvagCD, ccdAB</i>
I27	<i>E. coli</i>	I1; F; K; FIA; FIB; B/O	<i>PemKI</i>
N1	<i>E. coli</i>	I1; HI1. A/C; K; FIA; FIB; B/O	<i>srnBC, pndAC, hok-sok, ccdAB, parDE</i>
N8	<i>E. coli</i>	I1; F; K; FIA; FIB	<i>srnBC, hok-sok, ccdAB, PemKI</i>
N13	<i>E. coli</i>	(I1); N (tenue); FIB; A/C; B/O	<i>srnBC, pndAC, ccdAB</i>
N14	<i>E. coli</i>	I1; N; K; FIA; FIB; A/C; B/O	<i>srnBC, hok-sok, ccdAB, PemKI</i>
N15	<i>E. coli</i>	F, K, FIA, FIB	<i>srnBC, hok-sok, vagCD</i>
I12	<i>E. coli</i>	A/C; F	<i>srnBC, hok-sok, vagCD, ccdAB, PemKI</i>
C1	<i>E. coli</i>	I1; FIA; FIB; A/C; B/O	<i>pndAC, hok-sok, ccdAB, PemKI</i>
C17	<i>E. coli</i>	I1; FIA; FIB; A/C; F; B/O	<i>pndAC, hok-sok, srnBC, vagCD, ccdAB</i>
C24	<i>E. coli</i>	K; I1; FIA; FIB; A/C	<i>hok-sok, parDE, vagCD, ccdAB</i>

Se obtuvieron TC para 7 de los 10 aislamientos: C1, C13, C21, I9, I26, N1 y N14. Se informa que para C24, N15 e I27, bajo las condiciones del ensayo, no se obtuvieron TC. Los perfiles de sensibilidad obtenidos para las cepas F-, los aislamientos salvajes (F+) y TC fueron comparados, observándose que en la mayoría de los casos el perfil de hidrólisis dissociado a C3G se transfiere a la cepa F-, salvo en los TC obtenidos a partir de C1 y C21. Por otro lado, se observó que en los TC obtenidos de C13 y N1 se co-transfiere la resistencia a gentamicina (GEN) y el TC obtenido de N14 co-transfiere resistencia a trimetoprima/sulfametoxazol (TMS), permitiendo inferir que los mecanismos causales de tal fenotipo se encuentran en plásmidos movilizables al igual que las β -lactamasas evaluadas. En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos para los GI y STA encontrados, tanto para la cepa dadora, como para el TC.

Tabla 2. GI, STA y mecanismos de resistencia a C3G encontrados en los TC.

Rótulo	STA	GI	Mecanismo
C13	<i>hok-sok, relBE</i>	A/C, FIA, FIB, FIC	CTX-M G2
TOPC13d	<i>hok-sok</i>	A/C	CTX-M G2
I26	<i>pndAC</i>	I1, FIA, B/O	CTX-M G9
TOPI26a	-	I1, B/O	CTX-M G9
C21	<i>pndAC</i>	FIC	CTX-M G2
TOPC21b	-	-	CTX-M G2
I9	<i>srnBC, pndAC, relBE, ccdAB</i>	FIA, FIC	CMY
TOPI9a	-	-	CMY

CONCLUSIONES

Los principales mecanismos implicados en producir el fenotipo de resistencia disociada a C3G en enterobacterias corresponden a BLEE (principalmente CTX-M del grupo 2 y 9). Se observa una marcada presencia de STA en estos aislamientos, siendo los mayormente encontrados los sistemas *hok-sok* y *ccdAB*. Esta notoria presencia de STA se impone como un foco de interés, en vista de la importancia que tienen estos elementos movilizables, transferibles en el contexto de la diseminación de genes de resistencia. Mediante los ensayos de conjugación se pudo comprobar la capacidad de transferencia que poseen los plásmidos portadores de las β -lactamasas implicadas en la resistencia disociada a C3G, como a su vez, de mecanismos asociados a la resistencia de otros antibióticos (aminoglucósidos y TMS). A su vez se observa la transferencia de STA lo que implica la posibilidad de permanencia de los plásmidos en las células receptoras, aún en ausencia de presión de selección.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Canton, R.; Gonzalez-Alba, J. M. y Galan, J. C. (2012) *CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion*. Front Microbiol. 3: 110.
- Carattoli, A. (2009) *Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother. 53: 2227-2238.
- Carattoli, A.; Bertini, A.; Villa, L.; Falbo, V.; Hopkins, K. L. y Threlfall, E. J. (2005) *Identification of plasmids by PCR-based replicon typing*. J Microbiol Methods. 63: 219-228.
- Cejas, D.; Fernández Canigia, L.; Quinteros, M.; Giovanakis, M.; Vay, C.; Lascialandare, S.; Mutti, D.; Pagniez, G.; Almuzara, M.; Gutkind, G. y Radice, M. (2012) *Plasmid-Encoded AmpC (*pAmpC*) in Enterobacteriaceae: epidemiology of microorganisms and resistance markers*. Rev Argent Microbiol. 44: 182-186.
- CLSI, 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement., CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Leplae, R.; Geeraerts, D.; Hallez, R.; Guglielmini, J.; Dreze, P. y Van Melderen, L. (2011) *Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families*. Nucleic Acids Res. 39: 5513-5525.
- Mnif, B.; Vimont, S.; Boyd, A.; Bourit, E.; Picard, B.; Branger, C.; Denamur, E. y Arlet, G. (2010) *Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum β -lactamases in Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 65: 1599-1603.
- Pérez-Pérez, F. J. y Hanson, N. D. (2002) *Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR*. J Clin Microbiol. 40: 2153-2162.
- Sennati, S.; Santella, G.; Di Conza, J.; Pallecchi, L.; Pino, M.; Ghiglione, B.; Rossolini, G. M.; Radice, M. y Gutkind, G. (2012) *Changing epidemiology of extended-spectrum β -lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15*. Antimicrob Agents Chemother. 56: 6003-6005.
- Sambrook, J; Fritsch, E. y Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 1989.
- Taylor, D. E. y Brose, E. C. (1988) *Modified Birnboim-Doly method for rapid detection of plasmid copy number*. Nucleic Acids Res. 16: 9056.