

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

Estudio de β -lactamasas de espectro extendido y AmpC plasmídicas en *Enterobacterales*. Caracterización de plásmidos movilizables y conjugativos

Martín Luis Marchisio

Director de Tesis: Dr. José Alejandro Di Conza

Codirectora de Tesis: Dra. Emilce de los Ángeles Méndez

Cátedra de Microbiología General. FBCB. UNL

-2021-

AGRADECIMIENTOS

Finalizando este trabajo de tesis observo que este ha significado mucho esfuerzo y dedicación, pero por otro lado, ha sido sumamente enriquecedor, tanto en lo académico como en mi desarrollo personal y profesional. Son muchas las personas que de alguna manera ayudaron y permitieron que hoy pueda estar finalizando esta etapa. A todos ellos quiero expresar mi especial y sincero agradecimiento.

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional del Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por darme la posibilidad de realizar esta tesis.

Agradezco a mis directores, al Dr. José Di Conza y la Dra. Emilce Méndez, no solo por su dirección, apoyo, acompañamiento y excelente guía durante todo el periodo que llevó realizar este trabajo, sino también por su calidez, por los lindos momentos compartidos, por ser dos excelentes personas y por permitirme el enorme gusto de trabajar con ellos.

A la Dra. María Cristina Lurá por abrirme las puertas de la Cátedra de Microbiología General y permitirme realizar este doctorado.

A la Dra. Patricia Burns por permitirme tomarme el tiempo necesario para la redacción de este trabajo de tesis.

Al Dr. Gabriel Gutkind y todos los integrantes del Laboratorio de Resistencia Bacteriana, Cepario, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA. A cada uno de ellos gracias por brindarme un lugar, hacerme sentir uno más del laboratorio y poner todo a disposición cada vez que estuve allí o necesitaba una mano al realizar un ensayo. Siempre me sentí muy cómodo y disfruté mucho cada vez que estuve por allá. Un agradecimiento especial a la Dra. Giovanna Rincón por la enorme ayuda brindada cuando tuve que hacer mi primer PFGE.

A la Dra. Marcela Radice por su ayuda en el armado del plan de trabajo para esta tesis.

A todo el personal del área de microbiología de los Hospitales, la Cooperativa y el al Laboratorio Central de la Provincia de Santa Fe que colectaron los aislamientos para la realización de este trabajo.

Al Dr. Nilton Lincopan de la Universidad de San Pablo por las secuenciaciones de los aislamientos N1 y 97.

A María Rosa Baroni y Fernanda Argarañá por las caracterizaciones de los aislamientos mediante equipos automatizados.

A la Cátedra de Parasitología y Micología por permitirme utilizar varios de sus equipos necesarios para llevar adelante diversas técnicas incluidas en este trabajo.

A toda la gente de la Cátedra de Microbiología General por su apoyo y su ayuda durante todos estos años, y por cubrirme en los trabajos prácticos durante mis estancias en Buenos Aires o durante los diversos cursos que realicé en el transcurso de la carrera de doctorado.

A la Dra. Ayelén Porto por todas sus enseñanzas que me facilitaron introducirme en la temática de la resistencia a antibióticos.

A todos los pasantes y cientibecarios que colaboraron con este trabajo, Karen, Dani, Fede, Estefanía y Valentina.

A la Secretaría de Posgrado de la FBCB por responder siempre ante las dudas generadas durante el cursado de la carrera.

A mis viejos y mis hermanos por estar siempre y apoyarme en todo momento y a mis sobrinos por alegrarme todos los días de mi vida.

A mi amor, Evangelina, por todo, por estar siempre, por hacerme feliz todos los días, por apoyarme siempre, porque sin ella probablemente este título nunca hubiera sido posible. Gracias mi Amor!

A todos, simplemente GRACIAS!!!

Los resultados obtenidos en esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones.

- Marchisio, M. L., Liebrez, K. I., Mendez, E. de los. A., y Di Conza, J. A. (2021). Molecular epidemiology of cefotaxime-resistant but ceftazidime-susceptible *Enterobacterales* and evaluation of the *in vitro* bactericidal activity of ceftazidime and cefepime. *Braz J Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00574-4>.
- Espinosa, R. F., Rumi, V., Marchisio, M., Cejas, D., Radice, M., Vay, C., . . . Di Conza, J. (2018). Fast and easy detection of CMY-2 in *Escherichia coli* by direct MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods*, 148, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.04.001>

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	15
RESUMEN	21
ABSTRACT	28
INTRODUCCIÓN GENERAL	37
1.1 <i>Enterobacterales</i> (enterobacterias)	37
1.2 Clasificación y estructura química de los antibióticos β -lactámicos	39
1.3 Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos	46
1.4 Resistencia a β -lactámicos	47
1.5 Plásmidos de resistencia	48
1.5.1 Transferencia horizontal de plásmidos	50
1.6 Plataformas génicas	52
1.6.1 Integrones	52
1.6.2 Transposones y secuencias de inserción	55
1.7 El problema de la resistencia antibiótica	57
1.8 Justificación del estudio e hipótesis	59
1.8.1 Justificación del Estudio	59
1.8.2 Hipótesis	59
OBJETIVOS	63
Objetivo general	63
Objetivos específicos	63
CAPÍTULO 1: Resistencia a cefalosporinas de tercera generación en <i>Enterobacterales</i>	66
INTRODUCCIÓN	66
1.1 Inactivación enzimática de los antibióticos β -lactámicos por β -lactamasas	66
1.1.1 β -lactamasas cromosómicas	67
1.1.2 β -lactamasas plasmídicas	68
1.2 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)	68
1.2.1 Introducción e historia	68
1.2.2 Tipos de BLEE	70
1.2.2.1 β -lactamasas tipo TEM	70
1.2.2.2 β -lactamasas tipo SHV	71
1.2.2.3 β -lactamasas tipo CTX-M	71
1.2.2.4 Otras BLEE	74
1.3 β -lactamasas tipo AmpC	74
1.3.1 Introducción e historia	74

1.3.2 Tipos de AmpC	75
1.3.2.1 AmpC cromosómicas	75
1.3.2.2 AmpC plasmídicas	75
1.4 Carbapenemasas	76
1.4.1 Introducción e historia	76
1.4.2 Tipos de carbapenemasas	77
1.4.2.1 Carbapenemasas KPC	77
1.4.2.2 Metallo- β -lactamasas	78
1.4.2.3 Carbapenemasas OXA	78
1.5 Epidemiología de β -lactamasas	79
1.6 Factores clínicos asociados a la presencia de β -lactamasas	82
OBJETIVOS DEL CAPÍTULO	85
MATERIALES Y MÉTODOS	86
1.1 Aislamientos bacterianos	86
1.1.1 Colección de microorganismos	86
1.1.2 Identificación bacteriana	86
1.1.3 Determinación de relación clonal entre los aislamientos de <i>Salmonella</i>	86
1.1.4 Conservación de los microorganismos	87
1.2 Perfiles de sensibilidad a antibióticos	87
1.3 Detección fenotípica de β -lactamasas	87
1.3.1 Detección de BLEE	88
1.3.2 Detección de AmpC	88
1.3.3 Detección de carbapenemasas	89
1.4 Detección y caracterización molecular de β -lactamasas	89
1.4.1 Obtención de ADN total mediante lisis celular por calentamiento	90
1.4.2 Detección molecular de BLEE	90
1.4.3 Detección molecular de AmpC	94
1.4.4 Detección molecular de carbapenemasas	96
1.4.5 Electroforesis en geles de agarosa	97
1.5 Análisis estadístico	97
RESULTADOS	99
1.1 Estudio prospectivo de <i>Enterobacterales</i> con resistencia a CTG	99
1.1.1 Distribución de especies	99
1.1.2 Prevalencia de <i>Enterobacterales</i> resistentes a CTG	99
1.1.3 Detección fenotípica de β -lactamasas	100
1.1.3.1 Detección fenotípica de BLEE	100

1.1.3.2 Detección fenotípica de AmpC	103
1.1.3.3 Detección fenotípica de carbapenemasas	104
1.1.4 Caracterización genotípica de β -lactamasas	104
1.1.4.1 Caracterización de BLEE	105
1.1.4.2 Caracterización de AmpC	106
1.1.4.3 Caracterización de carbapenemasas	106
1.1.5 Prevalencia de β -lactamasas	106
1.2 Estudio retrospectivo de <i>Salmonella</i>	113
1.2.1 Aislamientos y distribución de serovariedades	113
1.2.2 Relación clonal	113
1.2.3 Perfil de sensibilidad a antibióticos	114
1.2.4 Caracterización genotípica de β -lactamasas	116
DISCUSIÓN	117
1.1 Estudio prospectivo de <i>Enterobacterales</i> con resistencia a CTG	117
1.1.1 <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> los <i>Enterobacterales</i> más prevalentes	117
1.1.2 Prevalencia de <i>Enterobacterales</i> resistentes a CTG	119
1.1.3 Las principales BLEE: CTX-M del grupo 1 y CTX-M del grupo 2	120
1.1.4 CMY la única AmpC plasmídica detectada	121
1.1.5 Solamente serino-carbapenemasas (KPC).....	122
1.2 Estudio retrospectivo de <i>Salmonella</i>	123
CAPÍTULO 2: Resistencia disociada a cefalosporinas de tercera generación y caracterización plasmídica	127
INTRODUCCIÓN	127
2.1 Resistencia disociada. Definición y antecedentes	127
2.1.2 Resistencia disociada en cefalosporinas de tercera generación	127
2.1.2.1 Antecedentes	127
2.1.2.2 Fenotipos disociados y marcadores en aislamientos resistentes a CTG	128
2.1.2.3 Epidemiología	128
2.1.2.4 Implicancias terapéuticas	128
2.2 Clasificación y caracterización de plásmidos	130
2.2.1 Tamaño y número de copias	130
2.2.2 Plásmidos conjugativos y movilizables	130
2.2.3 Grupos de incompatibilidad	132
2.2.4 Sistemas de adicción	133
2.2.5 Relaxasas	134
OBJETIVOS DEL CAPÍTULO	138

MATERIALES Y MÉTODOS	139
2.1 Detección de los aislamientos que presentaron fenotipo dissociado a CTG	139
2.2 Detección de los mecanismos responsables del fenotipo dissociado	139
2.3 Caracterización molecular de BLEE y AmpC responsables del fenotipo dissociado	139
2.3.1 Secuenciación	140
2.3.2 Análisis de secuencias y determinación de β -lactamasas	140
2.4 Transferencia de genes	140
2.4.1 Conjugación	141
2.4.2 Transformación por electroporación	142
2.4.2.1 Extracción de ADN plasmídico	142
2.4.2.2 Desalado de plásmidos	142
2.4.2.3 Obtención de células electrocompetentes	143
2.4.2.4 Electroporación	143
2.5 Perfiles de sensibilidad de transconjugantes.....	145
2.6 Perfil plasmídico	146
2.6.1 Preparación de <i>plugs</i> de agarosa	146
2.6.2 Digestión enzimática con S1 nucleasa	147
2.6.1 Electroforesis en gel de campo pulsado	148
2.7 Tipificación molecular de plásmidos	148
2.7.1 Tipificación de repicones (grupos de incompatibilidad)	148
2.7.2 Caracterización de sistemas de adicción	151
2.7.3 Tipificación de relaxasas (MOB)	152
RESULTADOS	155
2.1 Prevalencia de aislamientos resistentes a CTG con fenotipo dissociado	155
2.1.1 <i>Enterobacteriales</i> con fenotipo de resistencia dissociada a CTG	155
2.1.2 <i>S. enterica</i> con fenotipo de resistencia dissociada a CTG	155
2.2 Distribución de especies con fenotipo dissociado en <i>Enterobacteriales</i>	155
2.3 Caracterización fenotípica de los mecanismos de resistencia	156
2.4 β -lactamasas detectadas	156
2.4.1 BLEE	156
2.4.2 AmpC	157
2.5 Transferencia de plásmidos y perfiles de sensibilidad	158
2.6 Perfil plasmídico de aislamientos y transconjugantes	159
2.7 Grupos de incompatibilidad, sistemas de adicción y relaxasas	161
DISCUSIÓN	163
2.1 El fenotipo dissociado se presenta mayormente en <i>E. coli</i> y <i>P. mirabilis</i>	163

2.2 El fenotipo disociado se vincula principalmente a CTX-M-2 y CTX-M-14	164
2.3 Plásmidos: tamaño, grupos de incompatibilidad, sistemas de adición y relaxasas	166
CAPÍTULO 3: Cinética de muerte o letalidad	172
INTRODUCCIÓN	172
3.1 Curvas de cinética de muerte o letalidad (estudios de tiempo de muerte)	172
3.2 Tratamiento de infecciones causadas por bacterias productoras de β - lactamasas	172
3.2.1 Tratamiento de las infecciones por bacterias productoras de BLEE	172
3.2.2 Tratamiento de las infecciones por bacterias productoras de AmpC plasmídicas	173
3.2.3 Tratamiento de las infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas	174
3.2.4 Opciones terapéuticas para aislamientos con resistencia disociada	174
3.2.5 Terapias combinadas para el tratamiento de <i>Enterobacterales</i> productores de BLEE o AmpC	175
OBJETIVOS DEL CAPÍTULO	177
MATERIALES Y MÉTODOS	178
3.1 Curvas de cinética de muerte o letalidad	178
3.1.1 Determinación de actividad bactericida. Estudios de cinética de muerte usando un único antibiótico	178
3.1.2 Determinación de sinergia. Estudios de cinética de muerte usando combinación de dos antibióticos	179
RESULTADOS	181
3.1 Curvas de cinética de muerte (Actividad bactericida)	181
3.1.1 Aislamientos productores de CTX-M-2 y CTX-M-14 frente a CAZ	181
3.1.2 Aislamientos productores de CTX-M-2 y CTX-M-14 frente a FEP	182
3.1.3 Transconjugantes productores de CTX-M-2 y CTX-M-14 frente a CAZ	183
3.1.4 Aislamientos productores de CMY-2 frente a CAZ	184
3.1.5 Aislamientos productores de CMY-2 frente a CTX	184
3.1.6 Aislamientos productores de CMY-2 frente a FEP	185
3.1.7 Aislamientos productores de CMY-2 frente a GEN	186
3.1.8 Transconjugantes productores de CMY-2 frente a FEP	186
3.2 Sinergia entre ceftazidima y gentamicina	187
DISCUSIÓN	189

3.1 Actividad bactericida: CAZ es activo frente a las bacterias productoras de CTX-M-2 y CTX-M-14 y FEP frente a las productoras de CMY-2	189
3.2 Se observa sinergia entre CAZ y GEN frente a bacterias productoras de CMY-2	190
3.3 Alternativas terapéuticas para <i>Enterobacteriales</i> con fenotipo disociado	191
3.4 Propuesta de informe en el laboratorio de microbiología	194
CAPÍTULO 4: Análisis de genomas bacterianos	198
INTRODUCCIÓN	198
4.1 Secuenciación de nueva generación	198
4.2 Bioinformática	199
4.3 Calidad de secuencias crudas o lecturas	200
4.4 Ensamblado de lecturas	204
4.5 Anotación de secuencias	205
OBJETIVOS DEL CAPÍTULO	206
MATERIALES Y MÉTODOS	207
4.1 Secuenciación de genomas completos	207
4.2 Bioinformática.....	207
4.2.1 Análisis de calidad de las secuencias (Pre-procesamiento)	207
4.2.2 Ensamblado y análisis de calidad del ensamblado	207
4.2.3 Anotación de genomas	208
4.2.4 Caracterización mediante herramientas bioinformáticas	208
4.2.4.1 Flujo de análisis bioinformático bacteriano	208
4.2.4.2 Identificación de secuencias plasmídicas y ensamblado combinado de plásmidos	209
4.2.4.3 Análisis de las secuencias plasmídicas	210
4.2.4.4 Comparación de plásmidos	210
RESULTADOS	212
4.1 <i>E. coli</i> N1.....	212
4.1.1 Secuenciación y análisis de calidad de lecturas	212
4.1.2 Ensamblado de lecturas y generación de <i>contigs</i>	213
4.1.3 Anotación de genoma completo	214
4.1.4 Flujo de análisis bioinformático bacteriano	214
4.1.5 Reconocimiento de plásmidos y secuencias plasmídicas	216
4.1.6 Análisis del plásmido de interés (pN1)	216
4.1.7 Comparación de plásmidos con pN1	218
4.2 <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium 97	220
4.2.1 Secuenciación y análisis de calidad de lecturas	220

4.2.2 Ensamblado de lecturas y generación de <i>contigs</i>	221
4.2.3 Anotación de genoma completo	222
4.2.4 Flujo de análisis bioinformático bacteriano	222
4.2.5 Reconocimiento de plásmidos y secuencias plasmídicas	224
4.2.6 Análisis de los plásmidos pSeT97 y pQNR97	225
4.2.7 Comparación de plásmidos con pSeT97 y pQNR97	227
DISCUSIÓN	230
4.1 Evaluación de calidad de secuencias crudas obtenidas por NGS	230
4.2 Ensamblado y anotación de secuencias	231
4.3 Análisis bioinformático de secuencias y comparación de plásmidos	233
4.3.1 <i>E. coli</i> N1	233
4.3.2 <i>S. entérica</i> serovar Typhimurium 97	237
CONCLUSIONES	245
ANEXOS	252
BIBLIOGRAFÍA	258

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

β	beta
3´CS	región conservada 3´
5´CS	región conservada 5´
°C	grados centígrados
ADN	ácido desoxirribonucléico
AMC	amoxicilina / ácido clavulánico
AMK	amikacina
AMP	ampicilina
AmpCp	β-lactamasa AmpC plasmídica
AMS	ampicilina / sulbactam
APB	ácido fenil borónico
ATS	agar tripteína soya
AZT	aztreonam
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BLEA	β-lactamasa de espectro ampliado
BLEE	β-lactamasa de espectro extendido
CAZ	ceftazidima
CDS	secuencia de ADN codificante
CFZ	cefazolina
CIM	concentración inhibitoria minima
CIP	ciprofloxacina

CLV	ácido clavulánico
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMP	cloranfenicol
CTG	cefalosporina de tercera generación
CTS	caldo tripteína soya
CTX	cefotaxima
dNTP	deoxinucleósidos trifosfato
DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
ETP	ertapenem
FEP	cefepime
FOX	cefoxitina
GEN	gentamicina
g	gramo
h	hora (s)
I	intermedio
IMI	imipenem
Inc	grupo de incompatibilidad
IS	secuencia de Inserción
Kb	kilobases
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasa
LCPSF	Laboratorio Central de la Provincia de Santa Fe
L	litro

LB	caldo Luria Bertani
MBL	metalo- β -lactamasa
MER	meropenem
μ	micro
μg	microgramos
μL	microlitros
mg	miligramos
mL	mililitros
MLST	<i>multilocus sequence typing</i>
MOB	<i>mobility</i>
NAL	ácido nalidíxico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>next-generation sequencing</i>
NIT	nitrofurantoína
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	<i>open reading frames</i>
<i>oriT</i>	origen de transferencia
<i>oriV</i>	origen de replicación
OXA	oxacilina
pb	pares de bases
PBP	<i>penicillin-binding protein</i>
PBRT	<i>PCR-based replicon typing</i>
PFGE	<i>pulse field gel electrophoresis</i>

PTZ	piperacilina / tazobactam
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pMLST	<i>plasmid multilocus sequence typing</i>
R	resistente
rMLST	<i>ribosomal multilocus sequence typing</i>
rpm	revoluciones por minuto
rST	secuenciotipo ribosomal
s	segundo(s)
S	sensible
SADEBAC	Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica
ST	secuenciotipo
TA	temperatura de anillado
TET	tetraciclina
TC	transconjugante
TMS	trimetoprima / sulfametoxazol
Tn	transposón
UFC	unidades formadoras de colonias
ITU	infección del tracto urinario

RESUMEN

RESUMEN

Los *Enterobacterales* representan un amplio grupo de bacterias frecuentemente recuperadas de infecciones tanto nosocomiales como de la comunidad. Son agentes causantes de infecciones urinarias, abdominales, respiratorias, óseas, meníngeas y hasta de bacteriemias. Este grupo de bacterias se caracteriza por su plasticidad genómica y su capacidad para adaptarse a diversos ambientes y adquirir rápidamente nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos. La bacteria aislada con mayor frecuencia es *Escherichia coli* pero pueden encontrarse además otras especies pertenecientes a los géneros *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, entre otros.

Los β -lactámicos son los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacterales*, pero debido a un marcado incremento en la resistencia a esta familia de antimicrobianos; las cefalosporinas de tercera generación (CTG), cefepime (FEP) y los carbapenemes son actualmente los agentes más utilizados para el tratamiento de infecciones graves causadas por enterobacterias. Esta situación llevó a un uso desmedido e irresponsable de CTG y carbapenemes lo que ha permitido la aparición e incremento de mecanismos de resistencia a estos grupos de antimicrobianos, principalmente los mediados por enzimas. Las enzimas activas frente a CTG se conocen como β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y β -lactamasas tipo AmpC. Las BLEE son un grupo amplio de enzimas y en Argentina las más prevalentes son las conocidas como cefotaximasas del tipo CTX-M, siendo las principales variantes CTX-M-15 y CTX-M-2. En un contexto con alta prevalencia de cefotaximasas es previsible encontrar aislamientos que muestren un perfil de resistencia disociada a CTG, es decir, resistentes a cefotaxima (CTX) y sensibles a ceftazidima (CAZ). De esta manera, utilizando los actuales puntos de corte para β -lactámicos y criterios de interpretación propuestos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), que no contemplan totalmente la epidemiología local con respecto a BLEE, muchas de estas enzimas podrían no detectarse. Esto conduciría a la selección de tratamientos incorrectos incrementando el riesgo de muerte del paciente.

Muchos determinantes de resistencia se encuentran frecuentemente asociados a elementos genéticos capaces de movilizarse, ya sea intracelularmente, como transposones e integrones o entre células mediante plásmidos. Estos elementos favorecen la diseminación de resistencia a antibióticos. La combinación entre transposones e integrones provee la maquinaria necesaria para el reclutamiento de

genes de resistencia y la capacidad de movilizarlos hacia plásmidos transferibles. Muchos plásmidos son capaces de transferirse hacia otras células mediante conjugación y en este caso solo son transferidos ciertos grupos de plásmidos (conjugativos o movilizables). Dada la gran relevancia que poseen los plásmidos para dispersar mecanismos de resistencia resulta fundamental reconocerlos y clasificarlos, analizando su distribución y su relación con los diferentes hospedadores.

El objetivo principal de este trabajo de tesis se centró en analizar las β -lactamasas presentes en enterobacterias resistentes a CTG (BLEE, AmpC y carbapenemasas), describir los mecanismos asociados al fenotipo de resistencia disociada a CTG, evaluar su comportamiento *in vitro* frente a diferentes antibióticos y caracterizar distintos aspectos relacionados a los plásmidos que portan los genes involucrados.

Se estudiaron 60 aislamientos de *Enterobacterales* resistentes a al menos una CTG, obtenidos en dos meses no consecutivos durante los años 2012 y 2013 recolectados en distintos centros de salud de la ciudad de Santa Fe y, por otro lado, el total de aislamientos (n=52) de *Salmonella enterica* obtenidos en el año 2014 y remitidos al Laboratorio Central de la Provincia de Santa Fe (LCPSF). Todos los aislamientos fueron obtenidos en Santa Fe.

Los aislamientos fueron identificados usando pruebas bioquímicas manuales y sistemas automatizados y se determinaron los perfiles de sensibilidad a diferentes antibióticos por métodos cualitativos y cuantitativos. La detección y caracterización de β -lactamasas se realizó mediante estudios fenotípicos y genotípicos.

Se obtuvo una prevalencia del 8,89% (60/675) de *Enterobacterales* resistentes a CTG en la ciudad de Santa Fe. La distribución de especies que presentaron resistencia a al menos una CTG fue la siguiente: 31/60 *Klebsiella pneumoniae*, 16/60 *E. coli*, 6/60 complejo *Enterobacter cloacae*, 5/60 *Proteus mirabilis* y 2/60 *Serratia marcescens*.

De los 60 aislamientos estudiados se caracterizaron fenotípicamente como portadores de BLEE un total de 50. Se identificaron como productores de BLEE 13/16 *E. coli*, 28/31 *K. pneumoniae*, 4/5 *P. mirabilis*, 3/6 *E. cloacae* y 2/2 *S. marcescens*.

Para el caso de las β -lactamasas de tipo AmpC fueron detectadas en 3 aislamientos de *E. coli*, en 1 de *P. mirabilis* y el fenotipo característico de estas enzimas se observó en los 6 aislamientos de *E. cloacae*.

Se observó resistencia a los carbapenemes ensayados en 3 aislamientos de *K. pneumoniae*.

En los 50 aislamientos evaluados fue posible determinar un total de 51 BLEE, con la aclaración que 3 aislamientos de *K. pneumoniae* compartían dos clases diferentes de estas enzimas. A su vez, hubo 2 aislamientos (1 *P. mirabilis* y 1 *E. cloacae*) que mostraron fenotipo de BLEE a los que no se les encontró ninguna de las enzimas evaluadas.

La distribución de BLEE encontrada fue la siguiente: 21/51 CTX-M del grupo 1, 14/51 CTX-M del grupo 2, 5/51 CTX-M del grupo 9, 1/51 CTX-M del grupo 8/25 y 10/51 PER-2.

En 4 aislamientos se detectaron por PCR multiplex AmpC plasmídicas (AmpCp) de la variante CIT (CMY). Estos aislamientos fueron 3 *E. coli* y 1 *P. mirabilis*. Por otro lado, en los 6 aislamientos de *E. cloacae* se detectó la variante EBC que se corresponde con la AmpC cromosómica presente en esta especie bacteriana.

Se confirmó la enzima KPC en los 3 aislamientos de *K. pneumoniae* caracterizados fenotípicamente como portadores de carbapenemasas tipo KPC.

Entre los 52 aislamientos de *S. enterica* recuperados se encontraron 14 de ellos (todos *S. Typhimurium*) con sospecha de brote intrahospitalario. Mediante el protocolo estandarizado de PFGE se pudo establecer la relación clonal entre estos aislamientos y determinar el pulstipo característico (ARJPXX01.0344). A causa de esto se procedió a estudiar aquellos aislamientos no relacionados clonalmente y se incluye 1 representante del grupo clonal (n=39).

El 46,1% (18/39) de los aislamientos mostraron resistencia a CTX, 2 de ellos presentaron a su vez resistencia a FOX. Un total de 17/18 aislamientos se caracterizaron fenotípicamente como productores de BLEE. Uno de los aislamientos con resistencia a CTG y a FOX se caracterizó como productor de AmpCp.

En los 17 aislamientos productores BLEE se determinaron enzimas CTX-M del grupo 9 y el 82% (14/17) de los aislamientos productores de BLEE corresponden a *S. enterica* serovariedad Typhimurium, el resto pertenecen a las serovariedades Javiana, Infantis y Newport. En el aislamiento caracterizado como portador de AmpCp se confirmó la presencia de una variante CMY y el serotipo correspondiente a este aislamiento fue *S. Typhimurium*.

Dentro de los 60 aislamientos con resistencia a CTG 15 (25%) mostraron el fenotipo CTX resistente y CAZ sensible (CTX^R y CAZ^S). La prevalencia de aislamientos CTX^R y CAZ^S sobre el total de aislamientos registrados en los periodos evaluados fue del 2,2% (15/675). Las especies que mostraron resistencia disociada con fenotipo

CTX^R y CAZ^S fueron *E. coli* (n=11), *P. mirabilis* (n=3) y *K. pneumoniae* (n=1). Mediante PCR y secuenciación se caracterizaron las variantes CTX-M-2 (7/15), CTX-M-14 (5/15), CMY-2 (2/15) y CTX-M-15 (1/15) en *Enterobacterales*.

En *Salmonella* CTX-M-14 fue la única enzima detectada en los 17 aislamientos productores de BLEE, mientras que el aislamiento productor de AmpCp mostró la variante CMY-2. De los 17 aislamientos de *S. enterica* productores de BLEE, solo 2 mostraron fenotipo CTX^R y CAZ^S.

Se realizaron ensayos de conjugación bacteriana para transferir los plásmidos portadores de los genes de las β-lactamasas presumiblemente responsables de causar los fenotipos de resistencia disociada a CTG en *Enterobacterales* (n=15).

Posteriormente, se determinó el número y el tamaño de plásmidos por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) con digestión enzimática usando S1-nucleasa para los aislamientos y sus respectivos transconjugantes. Se realizó la clasificación de plásmidos por PCR mediante la caracterización del grupo de incompatibilidad (Inc), relaxasas y sistemas de adicción (sistemas toxina-antitoxina).

Por medio de ensayos de conjugación, 8/15 aislamientos con fenotipo disociado a CTG permitieron la obtención de transconjugantes.

A partir del análisis de los perfiles de sensibilidad de los transconjugantes obtenidos se observó que cuando el marcador de resistencia transferido fue CMY-2 o CTX-M-15 la célula receptora adquirió fenotipo de resistencia neta a CTG (CTX^R y CAZ^R), por el contrario, si el marcador transferido fue CTX-M-2 o CTX-M-14 la célula receptora adquirió fenotipo de resistencia disociada a CTG (CTX^R y CAZ^S).

Todos los aislamientos evaluados mediante PFGE mostraron de 1 a 3 plásmidos y en los transconjugantes, se observó solo un plásmido.

Los grupos de incompatibilidad mayormente encontrados fueron IncFIA, IncFIB e IncI1 en 10/15 aislamientos cada uno, seguido por IncA/C en 9/15 aislamientos y IncB/O en 7/15 aislamientos. Al analizar los transconjugantes, se observa que IncI1 fue asociado a plásmidos portadores de las β-lactamasas CMY-2, CTX-M-15 y CTX-M-2 y los grupos IncA/C e IncN a CTX-M-2.

Por su parte, el sistema de adicción *ccdAB* fue encontrado en 9/15 aislamientos, mientras que *pndAC*, *hok-sok* y *srnBC* se detectaron en 8/15 aislamientos cada uno. Los sistemas *pemKI* y *vagCD* se encontraron en 4/15 aislamientos cada uno. Solo en un transconjugante (TC C1) fue posible determinar los sistemas de adicción *ccdAB* y *pndAC* asociados al plásmido portador de CMY-2.

En cuanto a las relaxasas identificadas, se detectó MOB_{F12} en 3/15 aislamientos con resistencia disociada, MOB_{P11} en 3/15 aislamientos, MOB_{P12} en 2/15

aislamientos y finalmente, MOB_{H121} en 2/15 aislamientos. Sólo se caracterizó la relaxasa MOB_{H121} para el transconjugante correspondiente al aislamiento N1 productor de CTX-M-2.

Mediante curvas de cinética de muerte se evaluó la actividad bactericida de ciertos antibióticos, individuales o combinados, frente a aislamientos con fenotipo de resistencia disociada a CTG y transconjugantes asociados. De esta manera, la actividad bactericida de CAZ y FEP fue evaluada en 2 aislamientos productores de CTX-M-2 (*E. coli* N1 y *P. mirabilis* C13) y 2 productores de CTX-M-14 (*E. coli* N8 y *K. pneumoniae* I26). Por otro lado, se evaluó la actividad bactericida de CAZ, CTX, FEP, GEN frente a 2 aislamientos productores de CMY-2 (*E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9). Además, se determinó la sinergia CAZ más GEN frente a los aislamientos productores de CMY-2 (*E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9) usando curvas de cinética de muerte.

Se observó efecto bactericida sobre los 4 aislamientos productores de BLEE estudiados a las 24 h de incubación al ser enfrentados con CAZ a las dos concentraciones evaluadas (2 x CIM y 4 x CIM). El efecto totalmente opuesto se observó al ser enfrentados a FEP. Al evaluar a los transconjugantes asociados frente a CAZ también se observó efecto bactericida.

Cuando los aislamientos evaluados fueron productores de CMY-2 los antibióticos CAZ, CTX y GEN no fueron activos a ambas concentraciones, mostrando el recrecimiento hacia el final del ensayo. Por el contrario, FEP mostró efecto bactericida al enfrentarse a estos aislamientos productores de CMY-2. Por otro lado, se observó sinergia entre CAZ y GEN al enfrentar ambos antibióticos con los aislamientos productores de CMY-2.

Por último, se seleccionaron 2 de los aislamientos incluidos en el estudio, uno de *E. coli* portador de CTX-M-2 (N1) que mostró fenotipo de resistencia disociada a CTG y otro de *S. Typhimurium*, proveniente del brote intrahospitalario, portador de CTX-M-14 (97) a los cuales se les realizó secuenciación de genoma completo utilizando tecnología *next generation sequencing* (NGS). Se realizó el ensamblado *de novo* de las lecturas obtenidas a partir de las NGS realizadas sobre estos aislamientos y se realizó la anotación de los *contigs* generados.

Posteriormente, se realizó un análisis global de los *contigs* obtenidos para los aislamientos N1 y 97 usando diversas herramientas bioinformáticas, esto permitió tipificar a los aislamientos, reconocer y caracterizar principalmente el resistoma y el moviloma de los mismos. Más adelante, el análisis se focalizó sobre las secuencias plasmídicas, de esta manera se realizó un ensamblado manual de los *contigs* logrando obtener las secuencias de los plásmidos portadores de los genes *bla*_{CTX-M-2} para el

aislamiento N1 y *bla*_{CTX-M-14} para el aislamiento 97. Estos plásmidos se caracterizaron de acuerdo con su tamaño, grupo de incompatibilidad, relaxasa MOB y se evaluó la asociación de los genes de resistencia detectados a integrones, transposones y secuencias de inserción. Finalmente, las secuencias de los plásmidos obtenidos se compararon con las secuencias de otros plásmidos disponibles en bases de datos públicas.

La NGS para el aislamiento N1 obtuvo 12.011.894 lecturas. El ensamblado de estas produjo un total de 432 *contigs* con valores N50 de 88.406 pb y un L50 de 19.

El análisis global del total de los *contigs* permitió determinar el tamaño del genoma en 5.332.762 pb, tipificar al aislamiento de *E. coli* N1 con el secuenciotipo ST8125 del complejo clonal CC10, a su vez, se encontraron los marcadores de resistencia plasmídicos *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{TEM-1}, *aac(6')-Ib*, *aac(3)-IIa*, *sul1* (por duplicado) y *dfxA8*. Mediante el ensamblado combinado de *contigs* se obtuvo la secuencia del plásmido pN1 con un tamaño de 166.347 pb. El plásmido pN1 presentó el grupo de incompatibilidad IncA/C₂ (ST-3), la relaxasa MOB_{H121}, los marcadores de resistencia *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{OXA-2}, *aac(6')-Ib*, *sul1* (dos copias) y *qacEΔ1* (dos copias) agrupados en un integrón complejo clase 1. Flanqueando al integrón se encontraron transposones incompletos de la familia Tn3 (TnAs3 e ISEc63), el transposón completo Tn6196 y las secuencias de inserción IS4321R completa y una porción de la IS1326. Por fuera del integrón se encontraron los genes *aac(3)-IIa* y *bla*_{TEM-1} flanqueados por la ISEc63 incompleta y las secuencias completas de las ISKpn11 y ISKpn12. A su vez, el plásmido pN1 presentó los determinantes genéticos que codifican la maquinaria necesaria para llevar a cabo su conjugación (previamente comprobado *in vitro*).

pN1 mostró elevada identidad con plásmidos caracterizados previamente en la región, pUR-KP0923 y pUR-KP1025 en Uruguay y pS21 en Argentina (Santa Fe).

La NGS para el aislamiento 97 obtuvo 22.754.632 lecturas. El ensamblado de estas produjo un total de 140 *contigs* con valores N50 de 200.971 pb y un L50 de 9.

El análisis global del total de los *contigs* permitió determinar el tamaño del genoma en 5.121.450 pb, tipificar al aislamiento de *S. Typhimurium* 97 con el secuenciotipo ST19 y el secuenciotipo ribosomal rST3484. A su vez, se encontraron los marcadores de resistencia plasmídicos *bla*_{CTX-M-14} y *qnrB19*. Este aislamiento mostró relación genética por SPN (*single-nucleotide polymorphisms*) con otros 5 aislamientos con el mismo rST también aislados en Argentina.

Mediante el ensamblado manual de *contigs* se obtuvo la secuencia del plásmido pSeT97 con un tamaño de 102.541 pb. El plásmido pSeT97 presentó el grupo de incompatibilidad IncI1 (ST-80), la relaxasa MOB_{P12} y el marcador de

resistencia *bla*_{CTX-M-14}. Se identificaron y ubicaron la secuencia de inserción IS903B completa y porciones de las secuencias de inserción ISEcp1 e IS15DI flanqueando al gen codificante de la enzima CTX-M-14. A su vez presentó la maquinaria necesaria para llevar a cabo la conjugación bacteriana.

El plásmido pSeT97 es un plásmido autóctono que mostró elevada identidad con el plásmido pUR-EC07 caracterizado y obtenido en un aislamiento de *E. coli* de Uruguay.

También se obtuvo la secuencia completa del plásmido pQNR97, portador de *qnrB19*, el cual presentó un tamaño de 2.699 pb.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis, se puede concluir que la prevalencia de *Enterobacterales* resistentes a CTG en Santa Fe durante el período evaluado fue del 8,89 %, donde las BLEE son el principal mecanismo causal de este fenotipo. Por otro lado, la prevalencia de resistencia disociada a CTG fue del 2,2 %. Este fenotipo se observó principalmente en aislamientos de *E. coli* y *P. mirabilis* y asociado mayormente a las enzimas CTX-M-2 y CTX-M-14. En *S. enterica* productoras de CTX-M-14, el fenotipo CTX^R y CAZ^S mostró baja prevalencia (2/17).

Cuando el mecanismo de resistencia involucrado fue CTX-M-2 o CTX-M-14, se observó efecto bactericida usando CAZ como antibiótico pero no así al utilizar FEP. Por el contrario, los aislamientos productores de CMY-2 no fueron inhibidos por CAZ, pero FEP mostró actividad bactericida *in vitro*. Finalmente, GEN mostró sinergia cuando se usó en combinación con CAZ en estos aislamientos productores de CMY-2. Así, también se concluye que los *Enterobacterales* con perfil de resistencia disociado a CTG responden de manera diferente frente a CAZ o FEP. Es importante resaltar la identificación de bacterias con este fenotipo y discriminar entre productores de CTX-M o CMY-2, para decidir una terapia potencialmente efectiva que evite el uso de antimicrobianos de último recurso como los carbapenémicos.

ABSTRACT

The order *Enterobacterales* represents a large group of bacteria. Their species are frequently recovered from both nosocomial and community infections. They are causative agents of urinary, abdominal, respiratory, bone, meningeal infections and even bacteremia. This bacterial group is characterized by its genomic plasticity and its ability to adapt to various environments and rapidly acquire new mechanisms of resistance to antibiotics. The most frequently bacterium isolated from clinical samples is *Escherichia coli*, but other species belonging to genera *Klebsiella*, *Proteus*, *Enterobacter*, among others, can also be found.

β -lactams are the first choice of antibiotics for treatment of infections caused by *Enterobacterales*. Due to the increase in resistance to this antimicrobial family, third generation cephalosporins (TGC), cefepime (FEP) and carbapenems are currently the most widely used agents for treatment of serious infections caused by enteric bacteria. This situation led to an excessive and irresponsible use of TGC and carbapenems, which has allowed the emergence of resistance mechanisms to these groups of antimicrobials, mainly those mediated by β -lactamases. TGC-active enzymes are known as extended spectrum β -lactamases (ESBLs) and AmpC-type β -lactamases. ESBLs are a wide group of enzymes. In Argentina the most prevalent ESBLs are known as cefotaximases (CTX-M), of which the main variants are CTX-M-15 and CTX-M-2. In a context with a high prevalence of cefotaximases is expected to find isolates that show a dissociated resistance to TGC profile with resistance to cefotaxime (CTX) and susceptibility to ceftazidime (CAZ). In this way, using the current cut-off points for β -lactams and interpretation criteria proposed by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), which do not fully contemplate the local epidemiology with respect to ESBLs, many of these enzymes could not be well identified. This would lead to the selection of incorrect treatments increasing the risk of death of the patient.

Many resistance determinants are frequently associated with genetic elements capable to be mobilized, either intracellularly, such as transposons and integrons, or between cells by transferable plasmids. These elements promote the spread of antibiotic resistance. The combination of transposons and integrons also provides the necessary machinery for recruitment of resistance genes and ability to mobilize them into transferable plasmids. Many plasmids can be transferred to other cells by conjugation particularly those considered conjugative or mobilizable. Therefore, it is essential to recognize and classify them, analyzing their distribution and their relationship with different hosts.

The aim of this work is focused on analyzing β -lactamases present in TGC-resistant *Enterobacterales* (ESBL-, AmpC- or carbapenemase producers). It is mainly proposed to describe the mechanisms associated with dissociated resistance to TGC phenotype, evaluate its response *in vitro* against different antibiotics and characterize different aspects related to plasmids that carry the genes involved.

Sixty isolates of *Enterobacterales* resistant to at least one TGC were studied. These isolates were obtained in two non-consecutive months during 2012 and 2013 from different health centers in Santa Fe city. On the other hand, all isolates (n=52) of *Salmonella enterica* obtained in 2014 and remitted to *Laboratorio Central de la Provincia de Santa Fe* (LCPSF) were also studied.

All isolates were identified using biochemical tests and automated systems, and the antibiotic susceptibility profiles were determined by qualitative and quantitative methods. Detection and characterization of β -lactamases was carried out through phenotypic and genotypic studies.

A prevalence of 8.89% (60/675) of TGC-resistant *Enterobacterales* was observed. The species distribution that presented resistance to at least one TGC was the following: 31/60 *Klebsiella pneumoniae*, 16/60 *E. coli*, 6/60 *Enterobacter cloacae* complex, 5/60 *Proteus mirabilis* and 2/60 *Serratia marcescens*.

A total of 50/60 isolates were phenotypically characterized and identified as ESBLs producers: 13/16 *E. coli*, 28/31 *K. pneumoniae*, 4/5 *P. mirabilis*, 3/6 *E. cloacae* and 2/2 *S. marcescens*.

The AmpC-type β -lactamases were detected in 3 *E. coli* isolates, in 1 *P. mirabilis* strain and the characteristic phenotype of these enzymes was also observed in all *E. cloacae* isolates (n=6).

Resistance to carbapenems was observed in 3 *K. pneumoniae* isolates.

A total of 51 ESBLs were determined in the 50 isolates evaluated, clarifying that 3 *K. pneumoniae* isolates shared two different classes of ESBLs. In turn, there were 2 isolates (1 *P. mirabilis* and 1 *E. cloacae*) that showed an ESBL phenotype in which none of the evaluated ESBLs were found.

The ESBLs distribution was as follows: 21/51 CTX-M from group 1, 14/51 CTX-M from group 2, 5/51 CTX-M from group 9, 1/51 CTX-M from group 8/25 and 10/51 PER-2.

The CMY variant (a plasmid-mediated AmpC) was detected in 4 isolates by multiplex PCR. These isolates were 3 *E. coli* and 1 *P. mirabilis*. On the other hand, the

EBC variant corresponding to chromosomal AmpC was detected in all *E. cloacae* isolates (n=6).

Among 52 *S. enterica* isolates recovered, 14 were found (all *S. Typhimurium*) that presumably belonged to an in-hospital outbreak. Using the standardized PFGE protocol was possible to establish the clonal relationship between these isolates and determine their specific pulsotype (ARJPXX01.0344). Therefore, we proceeded to study those isolates not clonally related and 1 strain representative of this clonal group was included (n=39).

Resistance to CTX was observed in 46.1% (18/39) of *S. enterica* isolates studied. In turn, two of them showed resistance to FOX. A total of 17/18 isolates were phenotypically characterized as ESBLs producers and the remaining isolate (with resistance to TGC and FOX) was characterized as a plasmid AmpC producer.

In the 17 ESBL producers isolates, CTX-M group 9 enzymes were determined and 82% (14/17) of ESBL producers isolates correspond to *S. enterica* serovar Typhimurium, the rest of the isolates belong to Javiana, Infantis and Newport serovars. In the isolate characterized as AmpC producer (*S. Typhimurium*), the presence of a CMY variant was confirmed.

Among the 60 TGC-resistant isolates, 15 (25%) showed phenotype CTX resistant and CAZ susceptible (CTX^R and CAZ^S). The prevalence of CTX^R and CAZ^S phenotype over total isolates registered in the evaluated periods was 2.2% (15/675). The species that showed dissociated resistance with CTX^R and CAZ^S phenotype were *E. coli* (n=11), *P. mirabilis* (n=3) and *K. pneumoniae* (n=1). Using PCR and sequencing, CTX-M-2 (7/15), CTX-M-14 (5/15), CMY-2 (2/15) and CTX-M-15 (1/15) variants were characterized in *Enterobacteriales*.

In *Salmonella* CTX-M-14 was the only enzyme detected in 17 ESBL producers isolates, while the AmpCp producer isolate showed CMY-2 variant. Only 2 of 17 ESBL producers *S. enterica* isolates showed CTX^R and CAZ^S phenotype.

Bacterial conjugation assays were performed to transfer plasmids harbouring β -lactamase genes. These β -lactamase genes are presumably responsible for causing the dissociated resistance to TGC phenotypes in *Enterobacteriales* (n=15).

Later, number and size of plasmids were determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) with enzymatic digestion using S1-nuclease for isolates and their respective transconjugants. Plasmid classification was performed by PCR to characterize the incompatibility groups (Inc), relaxases and addiction systems (toxin-antitoxin systems).

By conjugation assays, 8/15 transconjugants were obtained from wild type isolates with dissociated resistance to TGC.

Analyzing susceptibility profiles of transconjugants obtained, it was observed that when the transferred enzyme was CMY-2 or CTX-M-15, the recipient cell acquired resistance to both TGC (CTX^R and CAZ^R), on the other hand, if the transferred marker was CTX-M-2 or CTX-M-14 the recipient cell acquires the same phenotype, that is dissociated resistance to TGC (CTX^R and CAZ^S).

All isolates evaluated by PFGE showed 1 to 3 plasmids. Only one plasmid was observed in each transconjugant evaluated.

The most common incompatibility groups found were IncFIA, IncFIB and IncI1 in 10/15 isolates, followed by IncA/C in 9/15 isolates and IncB / O in 7/15 isolates. When analyzing the transconjugants, it is observed that IncI1 was associated with plasmids carrying β -lactamases CMY-2, CTX-M-15 and CTX-M-2 whereas IncA/C and IncN groups to CTX-M-2.

On the other hand, the *ccdAB* addiction system was found in 9/15 wild type isolates, while *pndAC*, *hok-sok* and *srnBC* were detected in 8/15 isolates. The *pemKI* and *vagCD* systems were found in 4/15 isolates. Only in one transconjugant (TC C1) was determined the *ccdAB* and *pndAC* addiction systems associated with the plasmid encoding CMY-2.

Regarding relaxases analysis, MOB_{F12} was detected in 3/15 isolates with dissociated resistance, MOB_{P11} in 3/15 isolates, MOB_{P12} in 2/15 isolates and finally, MOB_{H121} in 2/15 isolates. Only MOB_{H121} relaxase was characterized in one transconjugant. It was detected in CTX-M-2-producing strain N1.

Using time-kill curves, the bactericidal activity of different antibiotics (alone or in combination) was evaluated against isolates with dissociated resistance phenotype to TGC and their associated transconjugants. In these assays, the CAZ and FEP bactericidal activity was evaluated in 2 CTX-M-2 producers isolates (*E. coli* N1 and *P. mirabilis* C13) and 2 CTX-M-14 producers (*E. coli* N8 and *K pneumoniae* I26). On the other hand, the CAZ, CTX, FEP and GEN bactericidal activity was evaluated against 2 CMY-2 producers isolates (*E. coli* C1 and *P. mirabilis* I9). Furthermore, using time-kill curves, synergy between CAZ and GEN was determined against CMY-2 producers isolates (*E. coli* C1 and *P. mirabilis* I9).

Bactericidal effect was observed on 4 ESBL producers isolates studied at 24 h of incubation when were confronted with CAZ at two concentrations (2 x MIC and 4 x MIC). Totally opposite effect was observed when confronted these isolates with FEP.

When the associated transconjugants were assessed against CAZ, the same bactericidal effect was observed.

Secondly, when the CMY-2 producers were evaluated, the antibiotics CAZ, CTX and GEN were not active at both concentrations, showing regrowth. On the contrary, FEP showed bactericidal effect when confronted with these CMY-2 producers isolates. On the other hand, synergy was observed between CAZ and GEN when confronting both antibiotics to CMY-2 producers isolates.

Finally, 2 isolates were selected, one CTX-M-2 producer *E. coli* (N1) that showed dissociated resistance phenotype to TGC and another CTX-M-14 producer *S. Typhimurium* (97) obtained from the nosocomial outbreak. On these two isolates whole genome sequencing was performed using next generation sequencing (NGS) technology. The *de novo* assembly of reads was carried out and generated contigs were annotated.

Subsequently, a global analysis of contigs obtained for both isolates was carried out using bioinformatics tools. This procedure mainly allowed typifying, recognizing, and characterizing their resistome and mobilome in both isolates.

Later, the analysis was focused on the plasmid sequences; in this way a manual assembly of contigs was carried out, obtaining the plasmid sequences carrying *bla*_{CTX-M-2} genes for isolate N1 and *bla*_{CTX-M-14} for isolate 97. These plasmids were characterized according to their size, incompatibility group, MOB relaxase and the association of resistance genes to integrons, transposons and insertion sequences was evaluated. Finally, the plasmids were compared with other plasmids sequences available in public databases.

The NGS performed for strain N1 obtained 12,011,894 reads. The assembly of these produced a total of 432 contigs with an N50 of 88,406 bp and an L50 of 19.

The global analysis of contigs allowed to determine genome size in 5,332,762 bp, and typify *E. coli* N1 as sequence type ST8125 that belongs to clonal complex CC10. In turn, the plasmid resistance genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{TEM-1}, *aac(6')-Ib*, *aac(3)-IIa*, *sul1* (duplicate) and *dfrA8* were found. By combined assembly of contigs, the pN1 plasmid sequence with a size of 166,347 bp was obtained. The pN1 plasmid belongs to IncA/C₂ (ST-3) incompatibility group, MOB_{H121} relaxase and the resistance markers *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{OXA-2}, *aac(6')-Ib*, *sul1* (two copies) and *qacEΔ1* (two copies) were clustered in a complex class 1 integron. Flanking this integron were found incomplete transposons that corresponds to Tn3 family (TnAs3 and ISEc63), the complete transposon Tn6196, the complete IS4321R insertion sequences and a portion of IS1326. Beyond this integron, the *aac(3)-IIa* and *bla*_{TEM-1} genes were found flanked by

part of *ISEc63* and the complete sequences of *ISKpn11* and *ISKpn12*. In turn, pN1 plasmid presented genetic determinants that encode the machinery necessary to carry out its conjugation (previously verified *in vitro*). The pN1 plasmid showed high identity with plasmids previously characterized in the region such as pUR-KP0923 and pUR-KP1025 in Uruguay and pS21 in Argentina (Santa Fe).

The NGS performed for strain 97 obtained 22,754,632 reads. A total of 432 contigs were obtained with values of N50=200,971 bp and L50= 9.

The global analysis of contigs allowed to determine genome size in 5,121,450 bp and typify the isolate 97 as *S. Typhimurium*, sequence type ST19 and the ribosomal sequence type as rST3484. Furthermore, plasmid resistance genes *bla*_{CTX-M-14} and *qnrB19* were found. This isolate showed a close genetic relationship by SPN (single-nucleotide polymorphisms) with 5 other isolates with the same rST also isolated in Argentina.

By manual assembly, the pSeT97 plasmid sequence with a size of 102,541 bp was obtained. The pSeT97 plasmid carrying *bla*_{CTX-M-14} belongs to IncI1 (ST-80) incompatibility group and possesses the MOB_{P12} relaxase. The complete *IS903B* and portions of the *ISEcp1* and *IS15DI* insertion sequences flanking the gene encoding CTX-M-14 enzyme were identified and located. In turn, this plasmid also presented the necessary machinery to carry out bacterial conjugation. The pSeT97 plasmid is an autochthonous plasmid that showed high identity with the plasmid pUR-EC07 characterized and obtained in an *E. coli* isolation from Uruguay.

The complete sequence of pQNR97, a 2,699 bp plasmid harbouring *qnrB19* gene, was also obtained.

According to the results, it is concluded that the prevalence of TGC-resistant *Enterobacterales* in Santa Fe during the evaluated period was 8.89%, where ESBLs were the main mechanisms of this phenotype. On the other hand, the global prevalence of dissociated resistance to TGC was 2.2% but among *Enterobacterales* resistant to any TGC, it was found 25% of isolates with dissociated resistance. This phenotype was observed mainly in *E. coli* and *P. mirabilis* isolates harbouring CTX-M-2 and CTX-M-14 although in CMY-2 producers was also found. In CTX-M-14 producers *S. enterica*, the CTX^R and CAZ^S phenotype was rare.

When the involved mechanism was CTX-M-2 or CTX-M-14, a bactericidal effect was observed using CAZ but not using FEP. However, those CMY-2 producers were not inhibited by CAZ, but FEP showed *in vitro* bactericidal activity. Finally, GEN exhibited a synergy effect when it was used in combination with CAZ in these last

isolates. Thus, it is also concluded that *Enterobacterales* with dissociated resistance profile to TGC responds differently against CAZ or FEP. It is important to highlight the identification of bacteria with this phenotype and to discriminate between CTX-M or CMY-2 producers, in order to decide a potentially effective therapy that avoids the use of last resort antimicrobials such as carbapenems.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1 *Enterobacterales* (enterobacterias)

Las enterobacterias forman parte natural de la microbiota gastrointestinal de humanos y animales (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010) y actualmente se encuentran ubicadas taxonómicamente dentro del orden *Enterobacterales* que constituye un gran grupo de bacilos gram negativos con 60 géneros y 250 especies (Adeolu et al., 2016). Este orden se divide en 7 familias: *Enterobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, y *Budviciaceae* (Adeolu et al., 2016), siendo las primeras cuatro familias las que presentan géneros causales de infecciones en humanos y animales (Morales-Lopez et al., 2019). La familia *Enterobacteriaceae* agrupa los principales géneros con implicancia clínica, tales como: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Salmonella*, *Shigella* y *Shimwellia*. Sin embargo, ciertos géneros anteriormente considerados taxonómicamente dentro de esta familia, tales como *Morganella*, *Proteus* y *Providencia*, han sido recientemente agrupado dentro de la nueva familia *Morganellaceae*; y otros géneros como *Yersinia* y *Serratia* dentro de la familia *Yersiniaceae* (Adeolu et al., 2016).

El orden *Enterobacterales* incluye bacilos gram negativos, que poseen un porcentaje de G+C en su ADN que varía entre el 39 al 59%, son móviles con flagelos peritricos o no móviles, de fácil crecimiento, anaerobios facultativos, que fermentan la glucosa y un amplio rango de carbohidratos, son oxidasa negativos y reducen los nitratos a nitritos. Las bacterias entéricas generalmente no causan enfermedad, exceptuando los géneros de *Salmonella*, *Shigella* y algunos patovares de *Escherichia coli*, que con considerados patógenos primarios 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 (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010). Estas bacterias son patogénicas, cuando adquieren factores de virulencia o cuando se encuentran fuera del tracto gastrointestinal. Son agentes causantes de infecciones urinarias, abdominales, respiratorias, óseas, meníngeas y hasta de bacteriemias. Pueden actuar además como patógenos oportunistas cuando las defensas del hospedero están disminuidas (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010). Dentro de las especies aisladas con mayor frecuencia en la clínica, se encuentra *E. coli*, pero pueden ser encontradas otras especies de enterobacterias tanto en infecciones adquiridas en la comunidad como en las adquiridas en los hospitales u otros centros de salud.

Como se mencionó anteriormente *Salmonella* es uno de los pocos géneros dentro del orden *Enterobacterales* considerado como patógeno primario. Es una bacteria que se transmite por vía oral a partir del consumo de alimentos contaminados. Es un importante problema de salud pública en todo el mundo, ya que produce 93,8 millones de las enfermedades transmitidas por los alimentos y causa 155.000 muertes por año (Eng et al., 2015). Se han identificado más de 2500 serotipos de *Salmonella* y más de la mitad de ellos pertenecen a *Salmonella enterica* que representa la mayoría de las infecciones por *Salmonella* en humanos (Eng et al., 2015; Guibourdenche et al., 2010). Las infecciones por *Salmonella* que involucran serotipos invasivos son a menudo potencialmente mortales y necesitan una terapia antibiótica adecuada y eficaz. La aparición de serotipos de *Salmonella* resistentes a múltiples fármacos está generando un gran impacto en la eficacia del tratamiento con antibióticos. Una prevalencia cada vez mayor de cepas multirresistentes puede conducir a un aumento en las tasas de mortalidad de las infecciones por este patógeno (Crump et al., 2011; Helms et al., 2005).

Es conocida y preocupante la emergencia de enterobacterias resistentes a una gran variedad de antimicrobianos de importancia clínica incluyendo al grupo de los β -lactámicos (Canton et al., 2012; Dhillon & Clark, 2012; Famiglietti et al., 2005; Jacoby, 2009; Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010).

Algunos estudios epidemiológicos indican que los serotipos de *Salmonella* multirresistentes son más virulentos que las cepas más sensibles, esto se refleja en el aumento de la gravedad de la enfermedad causada y una estancia más prolongada en internación de los pacientes infectados (Travers & Barza, 2002). A su vez, se ha observado que la resistencia a antibióticos genera un costo en el *fitness* bacteriano, como por ejemplo en la tasa de crecimiento, la cual se ve reducida en aislamientos que expresan marcadores de resistencia. Sin embargo, este costo se reduce gradualmente en el tiempo, permitiendo la adaptación hacia tasas de crecimiento normales lo que permite que las cepas resistentes sobrevivan durante largos períodos, incluso sin la presión selectiva proporcionada por un tratamiento antimicrobiano (Graesboll et al., 2014).

Se han propuesto medidas preventivas para eliminar la propagación de las infecciones por *Salmonella*. Si bien el mantenimiento de una higiene alimentaria eficaz y el saneamiento del agua siguen siendo las piedras angulares, son importantes medidas adicionales como la restricción del uso indiscriminado de antibióticos en los animales destinados al consumo (Eng et al., 2015).

1.2 Clasificación y estructura química de los antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana y entre ellos se encuentran muchos de importancia médica, como las penicilinas, las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenemes. Inhiben el último paso en la síntesis de la pared celular al acilar las proteínas de unión a penicilina (“penicillin-binding proteins”, PBP) involucradas en la unión de péptidos para formar peptidoglicanos. Los β -lactámicos interrumpen el proceso de transpeptidación terminal e induce la pérdida de viabilidad y lisis celular, lo que también se produce a través de procesos autolíticos desencadenados dentro de la célula bacteriana. Son antibióticos bactericidas (Pandey & Cascella, 2020). Debido a que la pared celular y sus mecanismos de síntesis son exclusivos de la bacteria, los antibióticos β -lactámicos son altamente selectivos y no tóxicos para las células del hospedador (Chambers, 2012).

Estos antibióticos comparten un componente estructural característico, el anillo β -lactámico (Figura 1). En conjunto, los antibióticos β -lactámicos suponen más de la mitad de todos los antibióticos que se producen y utilizan en todo el mundo (Pandey & Cascella, 2020).

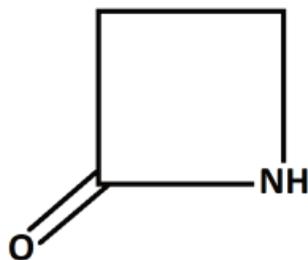


Figura 1: Anillo β -lactámico.

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo β -lactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además, tienen una cadena lateral en la posición 6 del anillo β -lactámico, que varía de unas penicilinas a otras y que es la que define sus propiedades. Las penicilinas pueden dividirse según su actividad antibacteriana (Yip & Gerriets, 2020).

Las cefalosporinas son fármacos cuya estructura básica está constituida por el anillo 7-aminocefalosporánico (Figura 2), que consiste en la fusión de un anillo dihidrothiacínico y un anillo β -lactámico. La introducción de modificaciones en las cadenas laterales de este anillo origina las diversas cefalosporinas.

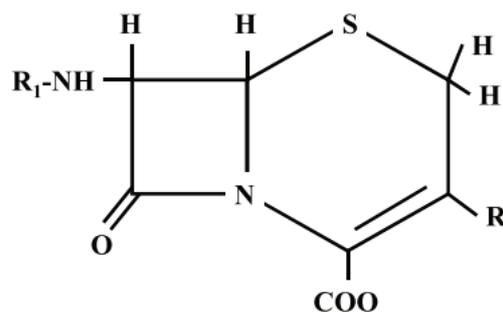


Figura 2: Anillo 7-aminocefalosporánico.

Las cefalosporinas de primera generación presentan mejor actividad frente a microorganismos gram positivos, con la excepción de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), neumococos resistentes a penicilina y enterococos resistentes de forma intrínseca a cefalosporinas. A su vez, son activas frente a las enterobacterias más sensibles (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*), incluidas cepas con alteraciones de las PBP, pero no frente a cepas productoras de β -lactamasas (ver sección 1.4). Actualmente, el desarrollo de nuevos fármacos, tanto cefalosporinas, como otros grupos, ha limitado bastante sus aplicaciones, de modo que estas se reducen, en buena parte, a procesos no complicados de infecciones extrahospitalarias, causados por microorganismos presuntamente sensibles. Son también útiles en profilaxis quirúrgica, fundamentalmente en intervenciones traumatológicas y en implantación de prótesis, en las que se pretende evitar sobre todo las infecciones por microorganismos gram positivos (Bui & Preuss, 2020).

La segunda generación mejora, tanto en espectro frente a bacterias gram negativas, como en actividad intrínseca, respecto a las de primera generación, aunque a costa de una cierta pérdida de actividad frente a bacterias gram positivas. En este grupo el aumento de espectro y la mayor actividad antimicrobiana, junto con la mayor disponibilidad de fármacos orales, incrementan de forma notable el número de procesos en que son potencialmente útiles, sobre todo en el ámbito extrahospitalario. Sin embargo, son muy pocas las infecciones en que alguna de estas cefalosporinas puede ser considerada como tratamiento de elección. Son prácticamente en todos los casos una alternativa más junto con otros fármacos. Gracias a su actividad frente a microorganismos gram positivos, especialmente estreptococos, y frente a *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., y *Moraxella* spp., son una alternativa en el tratamiento de diversos procesos otorrinolaringológicos (faringoamigdalitis, otitis, sinusitis), agudizaciones de origen infeccioso de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y otro tipo de infecciones respiratorias, infecciones del tracto urinario, y en el caso de cefuroxima, meningitis, aunque actualmente haya sido

desplazada por las cefalosporinas de tercera generación con mejores resultados. Un grupo de cefalosporinas de segunda generación conocidas como cefamicinas (ej. cefoxitina), fueron antibióticos adecuados para el tratamiento de infecciones mixtas causadas por microorganismos aerobios y anaerobios (infecciones intraabdominales, infecciones ginecológicas y otras infecciones de partes blandas), aunque en la actualidad han dejado de utilizarse porque generan resistencia durante el tratamiento. Además, no son muy recomendables en procesos graves, en los que quizá sean preferibles fármacos con mayor margen de seguridad frente a anaerobios, y en cuadros infecciosos adquiridos intranosocomio, en los que puede ser preferible la administración de agentes más activos frente a enterobacterias (Bui & Preuss, 2020).

Las cefalosporinas de tercera generación (CTG) incrementan notablemente el espectro, la actividad y la resistencia a la hidrólisis por la mayor parte de las β -lactamasas e introducen algunas características farmacocinéticas importantes, tal como es su buen acceso al líquido cefalorraquídeo. Las CTG más utilizadas en la práctica clínica son cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima. Se muestran muy activas frente a todos los cocos y bacilos gram negativos incluidos en el espectro de las generaciones anteriores y amplían su actividad a especies como *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp. y *Citrobacter* spp. Se muestran además activas frente a neumococos moderadamente resistentes a penicilina y otros estreptococos, pero pierden actividad en comparación con las generaciones precedentes frente a estafilococos. Su actividad frente a anaerobios es escasa. Cefotaxima y ceftriaxona apenas muestran eficacia frente *Pseudomonas aeruginosa*, en cambio ceftazidima tiene excelente actividad antipseudomónica (Andes & Craig, 2012) y frente a otros bacilos gram negativos no fermentadores de glucosa.

Cefotaxima es una aminotiazol-metoxi-imino cefalosporina con excelente actividad frente a enterobacterias, con las excepciones de las cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), carbapenemasas y aquellas con producción desreprimida de cefalosporinasas (AmpC) (ver clasificación de β -lactamasas en capítulo 1). Se muestra además muy activa frente a estreptococos, pero presenta escasa actividad sobre estafilococos y anaerobios. Tiene una vida media de una hora, lo que permite dosificarla cada 6 a 8 horas. Consigue una buena distribución en los tejidos y penetra bien en el líquido cefalorraquídeo, de modo que, a dosis altas, logra concentraciones que llegan a superar los 40 mg/L (Novick, 1982). Dada su excelente actividad frente a los patógenos meníngeos habituales, se convierte, junto con otras CTG, en un fármaco de elección en el tratamiento de la

meningitis bacteriana. Su excreción es fundamentalmente urinaria (Andes & Craig, 2012).

Ceftazidima es una aminotiazol-carboxi-propil-oxiimino cefalosporina. Es prácticamente inactiva frente a gram positivos y anaerobios, pero en cambio es muy activa frente a gram negativos, incluidos enterobacterias resistentes, *P. aeruginosa* y especies afines y *Acinetobacter* spp., debido a su baja afinidad por las β -lactamasas y su baja capacidad de inducción. Tiene una vida media aproximada de dos horas, que permite dosificaciones cada ocho horas, y penetra en el líquido cefalorraquídeo. Alcanza bien a los tejidos y se excreta fundamentalmente por vía urinaria. Las CTG antipseudomónicas, sobre todo ceftazidima, son una alternativa en cuadros en que la etiología por *Pseudomonas* spp. sea segura o probable, como las infecciones respiratorias en pacientes con fibrosis quística (Andes & Craig, 2012).

Las CTG constituyen un pilar fundamental de la terapéutica antimicrobiana, en especial en el ámbito hospitalario, donde tienen numerosas aplicaciones: infecciones respiratorias de adquisición nosocomial, infección del tracto urinario complicada, infecciones de piel y tejidos blandos de adquisición nosocomial, infecciones en inmunodeprimidos, etc. En todos estos casos, no obstante, ante la proliferación de infecciones hospitalarias por microorganismos potencialmente resistentes a CTG (cepas productoras desreprimidas de cefalosporinas, *P. aeruginosa* y especies afines, y cepas productoras de BLEE), puede ser recomendable no utilizarlas de forma aislada sino en asociación con otros fármacos. Estos antimicrobianos se hallan incluidos en la mayoría de los protocolos de tratamiento empírico de los pacientes neutropénicos febriles, habitualmente combinados con un aminoglucósido. Su empleo fuera del hospital debería ser limitado, reduciéndose en la práctica al tratamiento de algunos cuadros específicos (por ejemplo: gonococia y enfermedad de Lyme avanzada). Actualmente, su uso desmesurado está favoreciendo la proliferación, a nivel comunitario, de importantes mecanismos de resistencia como las BLEE (Arumugham & Cascella, 2020).

Las cefalosporinas de cuarta generación son moléculas semejantes a las CTG, en las que la presencia de un grupo no cargado en posición 7, y la introducción de radicales con carga positiva en posición 3, que compensan la carga negativa correspondiente al grupo carboxilo en posición 2, da lugar a moléculas con una carga eléctrica neta nula. Ésta es una estructura que mejora notablemente su penetración a través de la pared celular bacteriana. El fármaco representativo de este grupo es cefepime. En conjunto, se trata de cefalosporinas que mejoran notablemente la actividad de las de tercera generación frente a estafilococos sensibles a metilicina,

neumococos y otros estreptococos patógenos. Su actividad sobre los bacilos gram negativos productores de β -lactamasas plasmídicas clásicas (*E. coli*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp.) es similar a la de las CTG, pero frente a especies productoras de cefalosporinas cromosómicas inducibles o desreprimidas (*Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*) y frente a *P. aeruginosa* es mejor en comparación con ceftazidima. Son activas, *in vitro*, frente a aislamientos productores de algunas BLEE. Su actividad frente a anaerobios es limitada y sus principales indicaciones serían la neumonía nosocomial, en especial en áreas problemáticas (unidades de cuidados intensivos, unidades de quemados, hematología, etc.), episodios febriles en pacientes neutropénicos y cuadros sépticos de adquisición nosocomial, debido a la frecuente multirresistencia de los agentes etiológicos cuando las infecciones son de adquisición intrahospitalaria. También pueden estar indicadas en infecciones del tracto urinario nosocomiales complicadas, infecciones polimicrobianas de piel y tejidos blandos cuando están implicados estafilococos sensibles a meticilina, bacilos gram negativos y en infecciones intraabdominales, siempre combinados con un agente eficaz frente a anaerobios (Bui & Preuss, 2020).

Las cefalosporinas de quinta generación incluyen a la ceftarolina, que es un antimicrobiano de amplio espectro que es activo frente a gram positivos sensibles y organismos gram negativos. A su vez, es la única cefalosporina efectiva frente a SARM. También es activa frente a *Listeria monocytogenes* y *Enterococcus faecalis* pero no es efectiva frente a *P. aeruginosa* (Bui & Preuss, 2020).

Los antibióticos monobactámicos son derivados del ácido 3-aminomonobactámico (3-AMA). Tienen una estructura β -lactámica sencilla, con una estructura monocíclica en la que el anillo β -lactámico no está fusionado a otro secundario (Sykes et al., 1988) (Figura 3).

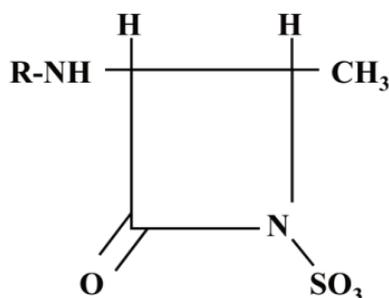


Figura 3: Anillo monobactámico.

El fármaco representativo de este grupo es aztreonam. Éste tiene un mecanismo de acción similar al del resto de los antibióticos β -lactámicos: tiene que

pasar a través de las porinas proteicas, resistir a la hidrólisis de las β -lactamasas del espacio periplásmico y ejercer su acción uniéndose a las PBP, a las que inhibe, produciendo directamente la lisis de la bacteria (ver más adelante el mecanismo acción). Aztreonam es muy sensible a la hidrólisis por las β -lactamasas bacterianas, tanto las codificadas por plásmidos, como las cromosómicas. Es poco inductor de β -lactamasas, incluidas las presentes en el cromosoma de *Pseudomonas* spp., lo que es importante desde el punto de vista de la aparición de resistencias intratratamiento (Lima et al., 2020).

Los carbapenémicos son los antibióticos β -lactámicos que presentan mayor espectro y actividad. Actúan, como otros β -lactámicos, uniéndose covalentemente a las PBP, inhibiendo la síntesis de la pared celular y activando autolisinas endógenas, con lo cual la célula muere rápidamente. Debido a su bajo peso molecular y su estructura hidrofílica deben penetrar en las bacterias gram negativas a través de porinas. Su acción se facilita por la estabilidad frente a un gran número de β -lactamasas, tanto de microorganismos gram positivos, como de gram negativos, cromosómicas o plasmídicas, aunque existen bacterias capaces de hidrolizarlos. Son potentes inductores de β -lactamasas de tipo C en enterobacterias y en *P. aeruginosa*, aunque habitualmente no producen desrepresión (Zhanel et al., 2007). Su estructura general se muestra en la figura 4. Son los antibióticos β -lactámicos más estables a la hidrólisis por β -lactamasas, siendo resistentes a la acción de la mayoría de estas enzimas (Pandey & Cascella, 2020). Poseen un espectro de actividad muy amplio. *In vitro* son activos frente a bacterias gram positivas (*S. aureus* meticilino sensibles, estafilococos coagulasa negativos, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp.), frente a bacterias gram negativas (*Neisseria* spp., *Moraxella* spp., enterobacterias, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Haemophilus* spp., *Brucella* spp., *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori*, *L. pneumophila*) y bacterias anaerobias (Zhanel et al., 2007).

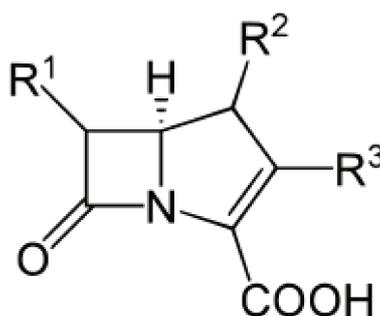


Figura 4: Estructura general de un carbapenem.

Deben emplearse en infecciones graves, polimicrobianas o nosocomiales, sobre todo si hay posibilidad de que estén producidas por bacterias multirresistentes. No son antibióticos de elección en infecciones leves ni en profilaxis quirúrgica. Pueden usarse como tratamiento empírico en pacientes neutropénicos febriles, siendo más útil meropenem en monoterapia por su mayor actividad frente a *P. aeruginosa*, en bacteriemias y septicemias de origen desconocido, en infecciones intraabdominales, en neumonías nosocomiales, en meningitis (sólo cuando se sospecha la presencia de bacilos gram negativos resistentes a otros antibióticos), en infecciones de tejidos blandos y osteoarticulares, en infecciones graves y complicadas del tracto urinario. Son especialmente útiles en infecciones por *Acinetobacter* spp., como endocarditis o neumonía (Pandey & Cascella, 2020; Zhanel et al., 2007).

Los inhibidores de β -lactamasas pueden clasificarse según su mecanismo de acción en competitivos (si el inhibidor y el sustrato compiten por el lugar activo de la enzima), o no competitivos (si no se producen interferencias entre el inhibidor y el sustrato, debido a que se unen a lugares diferentes de la enzima). A su vez, la inhibición puede ser reversible, si la enzima recupera su acción después de desligarse del inhibidor; o irreversible, si la enzima permanece inactiva incluso después de liberarse del inhibidor debido a una alteración química y conformacional.

Un tipo particular de inhibición irreversible es conocida como inhibición "suicida", en la cual la enzima queda modificada e inactiva y el inhibidor se autodestruye. Los inhibidores β -lactámicos suicidas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) exhiben este tipo de cinética de inhibición, aunque en las primeras fases se comportan como inhibidores competitivos debido a la similitud estructural con las moléculas a que se asocian (Tooke et al., 2019). Avibactam es un inhibidor no β -lactámico que inhibe la actividad β -lactamasa mediante acilación. A su vez, presenta un espectro de inhibición que abarca enzimas de las clases A, C, y algunas de la D de la clasificación de Ambler (1980). De esta manera, presenta la capacidad de inhibición sobre las BLEE, β -lactamasas tipo AmpC y KPC (Ehmann et al., 2013).

En la tabla 1 se resumen los principales antibióticos β -lactámicos de uso clínico.

Tabla 1: Clasificación de los antibióticos β -lactámicos.

Clase	Tipo	Antibióticos
Penicilinas	Isoxazolpenicilinas	Cloxacilina
	Aminopenicilinas	Ampicilina / amoxicilina
	Ureidopenicilinas	Piperacilina
Cefalosporinas	Primera generación	Cefalotina
		Cefazolina
		Cefalexina
	Segunda generación	Cefoxitina
		Cefuroxima
		Cefaclor
	Tercera generación	Ceftazidima
		Cefotaxima
		Ceftriaxona
		Cefepime
Cuarta generación	Cefpiroma	
	Ceftarolina	
Monobactámicos o monobactamas		Aztreonam
Carbapenémicos o carbapenemes	Carbapenemes	Imipenem
	4- β -metilcarbapenem	Meropenem
	1- β -metilcarbapenem	Ertapenem
Inhibidores de β-lactamasas	Sulfonas del ácido penicilánico	Sulbactam
		Tazobactam
	Oxapenamas o clavamas	Ácido clavulánico
	No β -lactámico	Avibactam

1.3 Mecanismo de acción de los antibióticos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son moléculas con estructuras químicas diversas, pero que tienen en común la presencia del anillo β -lactámico en su molécula (Figura 1). La similitud estereoquímica de este anillo con el dipéptido d-alanina-d-alanina les permite a los β -lactámicos interactuar con diversas proteínas con actividad de transpeptidasas y carboxipeptidasas situadas en la superficie de la membrana plasmática bacteriana (Tipper & Strominger, 1965). Estas moléculas son las encargadas de modelar la configuración definitiva de la capa del peptidoglicano, además de guiar su reorganización durante la división de las bacterias. Las transpeptidasas y carboxipeptidasas son inhibidas por acilación, formando ésteres estables con el anillo β -lactámico, esto impide la reacción de transpeptidación, por lo

que la pared celular se debilita y la bacteria se lisa (Matagne et al., 1998). Las proteínas transpeptidasas y carboxipeptidasas, que constituyen el blanco de los antibióticos β -lactámicos, se conocen con el nombre general de proteínas de unión a penicilina (PBP) (Spratt, 1983). La afinidad de los diferentes β -lactámicos por estas proteínas es variable. Así, por ejemplo, imipenem posee mayor afinidad por las PBP-2, PBP-4 y PBP-5 en comparación a las PBP-1, PBP-6 y PBP-3 presentes en *E. coli* (Jones, 1985). Las PBP-1 son transpeptidasas de cuya acción depende la integridad estructural de la pared hasta el punto de que, cuando su actividad es inhibida, las bacterias se convierten en esferoplastos que no resisten la presión osmótica y se lisan. Las aminopenicilinas tienen afinidad por PBP-2. Cefotaxima y aztreonam, entre otros, se fijan con elevada afinidad a PBP-3 (Costa & Botta, 1984), proteína que interviene en la división bacteriana. La acción bactericida de los antibióticos β -lactámicos no está ligada directamente a la interferencia con la síntesis del peptidoglicano. El bloqueo de las PBP permite la participación de enzimas hidrolíticas (autolisinas endógenas) y como consecuencia se produciría la lisis (Tomasz, 1979). Por lo tanto, los β -lactámicos para ejercer su acción deben ser capaces de llegar a las PBP. Esto resulta más sencillo en los microorganismos gram positivos, pero se dificulta en microorganismos gram negativos y micobacterias. Por eso, en gram negativos, deben aprovechar la presencia de poros proteicos (porinas) presentes en la membrana externa para acceder al sitio diana. Además, la acción del β -lactámico no es posible si la bacteria no se está multiplicando, porque ese es el momento de síntesis de la pared celular y de actuación de las PBP. Es decir, el efecto antimicrobiano se ejerce principalmente en fase de crecimiento exponencial (Yip & Gerriets, 2020).

I.4 Resistencia a β -lactámicos

La resistencia a β -lactámicos puede producirse por mecanismos tales como: modificación del sitio diana (PBP) o síntesis de moléculas alternativas, modificación de la membrana bacteriana externa mediante la reducción de la permeabilidad, expulsión activa del antibiótico fuera de la célula mediante eflujo o por la acción de enzimas específicas denominadas β -lactamasas que modifican o inactivan al antibiótico. Estos mecanismos no tienen por qué darse de forma aislada, sino que dos o más pueden interactuar para determinar el nivel final de resistencia de un microorganismo. Sin embargo, el mecanismo de resistencia más relevante a β -lactámicos en bacterias gram negativas, y especialmente en *Enterobacterales* es la producción de β -lactamasas (Canton et al., 2012; Dhillon & Clark, 2012; Gutkind et al., 2013; Jacoby, 2009; Patel & Bonomo, 2013).

1.5 Plásmidos de resistencia

Las bacterias pueden portar elementos genéticos extracromosómicos y con capacidad autorreplicante llamados plásmidos. Por definición, un plásmido es una molécula de ADN circular de doble hebra capaz de replicarse de forma autónoma. A su vez, los plásmidos no codifican genes esenciales para el crecimiento de las células que los portan y tienen sistemas que garantizan su replicación autónoma pero también presentan mecanismos que controlan su número de copias y aseguran una herencia estable durante la división celular (Carattoli, 2009).

Los plásmidos son vehículos importantes para la rápida adaptación de las poblaciones bacterianas a los cambios externos, ya que pueden proporcionar varios rasgos accesorios que pueden resultar beneficiosos en determinadas condiciones (Smalla et al., 2015). Son capaces de promover la transferencia horizontal de genes entre bacterias de diferentes géneros e, inclusive microorganismos de otros reinos a través del proceso de conjugación (Carattoli, 2009). La transferencia de genes mediada por plásmidos juega un papel importante no solo en la movilización y diseminación de genes de resistencia a antibióticos, sino también en la diseminación de vías degradativas y determinantes de virulencia de patógenos. La transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos se reconoce como una fuerza impulsora importante para la adaptación y diversificación bacterianas. Sin duda alguna, la propagación de genes de resistencia a antibióticos mediada por plásmidos entre bacterias de diferentes taxones es uno de los ejemplos más impresionantes de plasticidad bacteriana en respuesta a diversas presiones selectivas (Smalla et al., 2015).

Muchos plásmidos pueden verse como elementos “egoístas”, genomas dentro del genoma bacteriano, que llevan funciones específicas que pueden activar su origen de replicación. Sin embargo, los plásmidos naturales han evolucionado como parte integral del genoma bacteriano, proporcionando funciones adicionales a sus portadores. En muchos casos, la ventaja selectiva de un plásmido parece obvia, porque lleva genes que confieren un fenotipo seleccionable, como la resistencia a los antimicrobianos. Los genes de resistencia ubicados en plásmidos ofrecen una ventaja inmediata a su huésped bajo presión antimicrobiana. Se ha descrito que varios plásmidos de resistencia portan factores de virulencia, como bacteriocinas, sideróforos o factores de adhesión y se ha observado que los plásmidos de virulencia portan genes de resistencia. Estas características pueden ayudar a la propagación exitosa de ciertos tipos de plásmidos específicos entre bacterias de diferentes fuentes y orígenes geográficos (Carattoli, 2011).

Los plásmidos representan uno de los desafíos más difíciles para contrarrestar la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos, incluso entre taxones no relacionados. Se identificaron plásmidos indistinguibles en cepas bacterianas no relacionadas aisladas en diferentes áreas geográficamente distantes, sin vínculos epidemiológicos aparentes (Carattoli, 2013). Los plásmidos pueden conferir resistencia a múltiples fármacos tales como, β -lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprima, macrólidos y quinolonas; estos plásmidos de multirresistencia suelen ser grandes (> 50 kb), conjugativos y codifican mecanismos sofisticados que controlan su número de copias y regulan la tasa de replicación (Carattoli, 2013).

Por otro lado, los plásmidos considerados promiscuos se encuentran en un amplio rango de huéspedes y a menudo codifican mecanismos de restricción / antirrestricción y sistemas de partición, lo que garantiza una herencia estable durante la división celular. Los plásmidos también adquieren elementos genéticos móviles (secuencias de inserción, transposones) que vehiculizan genes de resistencia a antimicrobianos.

Muchos plásmidos codifican sistemas de adicción generalmente basados en factores toxina-antitoxina, que son capaces de matar a las células hijas que no heredan el plásmido durante la división celular. Estos sistemas promueven eficazmente el mantenimiento del plásmido en la población bacteriana, independientemente de otra presión selectiva, y no proporcionan ningún beneficio aparente a la bacteria que aloja el plásmido (Hayes & Van Melderen, 2011). Sin embargo, la mayoría de los plásmidos confieren fenotipos de selección positiva con la presencia de genes de resistencia a los antimicrobianos.

La capacidad de reconocer y categorizar plásmidos en grupos homogéneos sobre la base de su relación filogenética es útil para analizar su distribución en la naturaleza y su relación con las células hospederas y para descubrir sus orígenes evolutivos. La identificación y clasificación de plásmidos debe basarse en rasgos genéticos presentes y constantes. Estos criterios se cumplen mejor con los rasgos relacionados con el mantenimiento del plásmido, especialmente los controles de replicación (DeNap & Hergenrother, 2005).

La variabilidad de los plásmidos que median la resistencia a los antimicrobianos en *Enterobacterales* es alta pero no enorme. Hay familias de plásmidos que son ampliamente prevalentes y también plásmidos asociados predominantemente con genes de resistencia específicos (Carattoli, 2009).

I.5.1 Transferencia horizontal de plásmidos

La conjugación fue observada por primera vez por Lederberg y Tatum en 1946, quienes demostraron que las bacterias podían intercambiar información genética a través de la transferencia unidireccional de ADN, mediada por el llamado factor F (factor de fertilidad). La conjugación es un proceso replicativo que deja tanto a las células donantes como a las receptoras con una copia del plásmido (Bennett, 2008). A su vez, es un proceso ubicuo que ocurre en comunidades bacterianas presentes en ambientes como el suelo, en la superficie de las plantas, aguas residuales, en biopelículas y comunidades bacterianas asociadas a hospedadores vegetales o animales. Dentro de estos nichos, la conjugación facilita la adaptación de cepas bacterianas al mediar en la propagación de propiedades metabólicas ventajosas, como el estilo de vida simbiótico, virulencia o resistencia a metales pesados y antimicrobianos. Por tanto, la conjugación es un factor importante de la rápida evolución de los genomas bacterianos (Virolle et al., 2020).

Los plásmidos conjugativos son sin duda los impulsores más importantes de la propagación de resistencia a antibióticos en *Enterobacterales* que incluyen algunos de los patógenos nosocomiales más importantes. De manera crucial, algunas de estas asociaciones plásmido-bacteria se vuelven particularmente exitosas, creando "superbacterias" que se diseminan incontrolablemente en entornos clínicos (San Millan, 2018). Este tipo de plásmidos portan todos los genes necesarios para su mantenimiento durante la transferencia vertical desde la célula madre a las células hijas, así como los genes necesarios para la transferencia horizontal durante la conjugación del donante a la célula receptora. Estas funciones están codificadas por diferentes regiones o módulos que componen lo que generalmente se conoce como el esqueleto del plásmido. Este esqueleto del plásmido F está compuesto por las regiones *tra* que codifican todos los genes involucrados en la transferencia por conjugación; el origen de la transferencia *oriT*; la región principal, que es la primera que se transfiere a la célula receptora; y la región de mantenimiento implicada en la replicación y partición del plásmido (Virolle et al., 2020).

La conjugación consta de 3 pasos bien definidos: 1) contacto de célula a célula, 2) acoplamiento y 3) transferencia del ADN a través de un pili conjugativo o pelo sexual (Huddleston, 2014). El inicio de la conjugación requiere la expresión de los genes *tra*. Algunas de las proteínas Tra expresadas forman el pili conjugativo o pelo sexual, el cual es parte de la maquinaria del sistema de secreción tipo IV (T4SS), que reclutará a la célula receptora y mediará en la estabilización del apareamiento. El pelo sexual actúa como un gancho de agarre para unir las células dadora y receptora,

luego se retrae para efectuar el contacto de envoltura con envoltura y, cuando se forma un poro de transferencia de ADN, permite la unión entre los compartimentos citoplasmáticos de las células unidas (Bennett, 2008). Otras proteínas Tra constituyen el relaxosoma (Tral, TraM y TraY) que, en combinación con el factor de integración del huésped (IHF), se unen al *oriT* y preparan el plásmido para la transferencia induciendo la reacción de corte por la relaxasa Tral. La interacción entre el relaxosoma y la proteína de acoplamiento de tipo IV (T4CP) inicia la transferencia de una de las hebras del plásmido (hebra T, *transferred strand*) por el T4SS. La transferencia de la hebra T unida a Tral en el receptor es concomitante con la conversión del ADN simple cadena en ADN doble cadena por replicación de círculo rodante (RCR) en la célula dadora. Al entrar en la célula receptora, la hebra T de ADN simple cadena está recubierta por la proteína SSB (*single-strand binding protein*) cromosómica del hospedador y el promotor monocatenario *Frpo* adopta una estructura de tallo-bucle reconocida por la ARN polimerasa del hospedador para iniciar la síntesis de cebadores de ARN. Tral realiza la circularización de la hebra T completamente internalizada. A continuación, el dúplex de ARN-ADN es reconocido por la ADN polimerasa del hospedador para iniciar la reacción de síntesis de la cadena complementaria. Finalmente, una vez que se completa la conversión del plásmido de ADN simple cadena en ADN doble cadena, la expresión del gen del plásmido da como resultado la conversión fenotípica de la célula receptora en una célula transconjugante (Virolle et al., 2020). Estos pasos se muestran esquemáticamente en la figura 5.

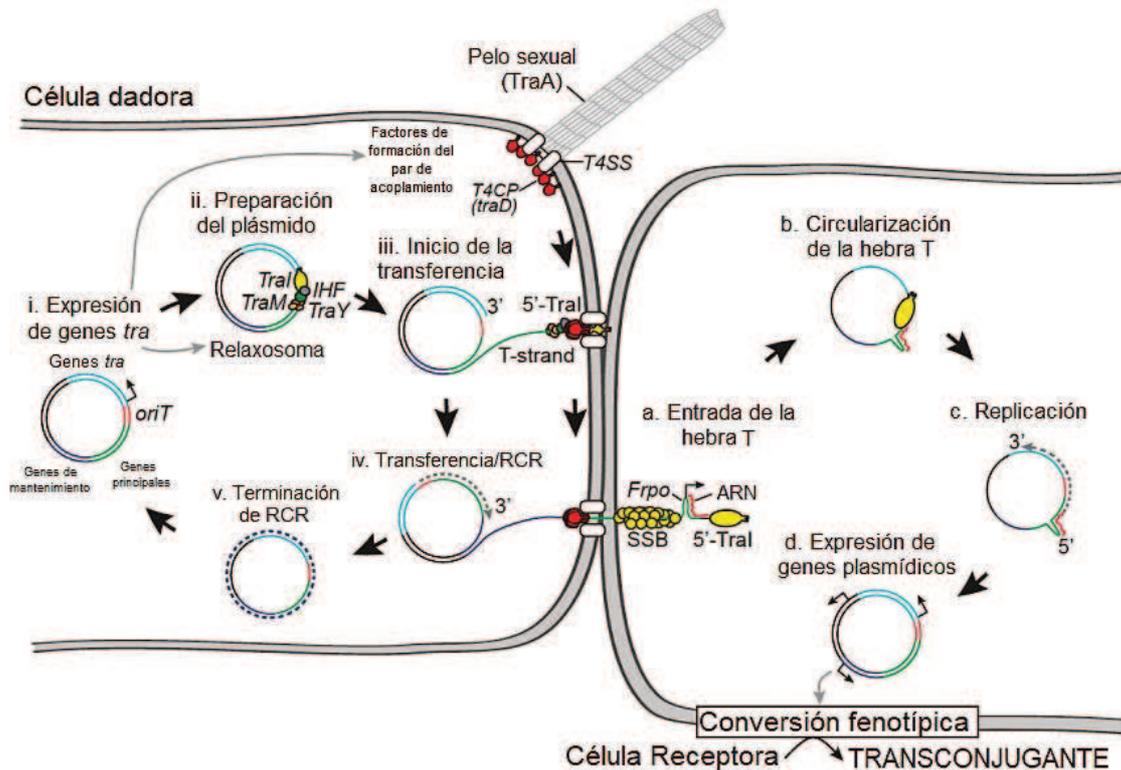


Figura 5: Diagrama esquemático del ciclo de vida del plásmido F durante la transferencia por conjugación desde el donante a la célula receptora (Figura modificada de Virolle et al. (2020)).

1.6 Plataformas génicas

Las plataformas génicas o elementos genéticos móviles se dividen en dos tipos generales: 1) elementos que pueden moverse de una célula bacteriana a otra, que incluye a los ya mencionados plásmidos de resistencia y 2) elementos que pueden moverse de una ubicación genética a otra en la misma célula. Estos últimos elementos incluyen transposones de resistencia y genes en casetes capaces de introducirse en integrones. Los plásmidos se transfieren de una célula a otra mediante mecanismos que implican la replicación. Los transposones y los casetes de genes requieren alguna forma de recombinación, que puede o no también incluir alguna forma de replicación. Los plásmidos resultan elementos genéticos dinámicos que acumulan e intercambian genes de resistencia a antibióticos (entre otros) como consecuencia de las actividades de al menos estos dos sistemas de recombinación (Bennett, 2008).

1.6.1 Integrones

Los integrones son estructuras genéticas capaces de movilizar genes de resistencia a los antibióticos y se definen como “un elemento dinámico que contiene los determinantes genéticos de los componentes de un sistema de recombinación

específica de sitio que reconoce y captura genes en casete móviles” (Hall & Collis, 1995). La estructura básica de los integrones se muestra en la figura 6.

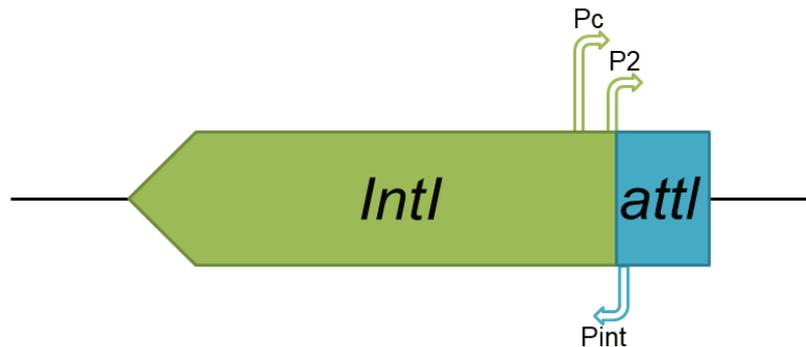


Figura 6: Estructura básica de los integrones. Poseen un fragmento que codifica una integrasa (*intI*) y una secuencia, denominada *attI*, a la que se integran los genes en casetes. Dentro de *intI*, en su extremo 3', hay secuencias promotoras, llamadas Pc y P2. Pint es el promotor de la expresión de la integrasa (Figura modificada de Di Conza y Gutkind (2010)).

Los genes en casetes que codifican diferentes mecanismos de resistencia se integran en la secuencia *attI*. Estos genes son expresados gracias a los promotores Pc y P2 presentes en el integrón, ya que los mismos carecen de promotores propios. Pero para ser integrados, estos casetes de genes presentan una secuencia específica denominada *attC*, la cual se une, por recombinación, a la secuencia *attI* del integrón o a secuencia *attC* de otro casete integrado mediante la actividad enzimática de la integrasa. A su vez, la integrasa, que pertenece a la familia de las tirosina-recombinasas, promueve que la orientación del casete sea adecuada para su expresión (Bennett, 2008).

Los integrones pueden adquirir nuevos determinantes, no solo marcadores de resistencia, sino también de virulencia, nuevas funciones metabólicas, etc., lo cual brinda a la bacteria hospedadora una amplia versatilidad para adaptarse a nuevas condiciones de supervivencia (Boucher et al., 2007).

Los integrones se clasifican según la secuencia de aminoácidos de su integrasa. A su vez, cuando estos elementos están asociados a secuencias de inserción, transposones y/o plásmidos conjugativos se habla de “integrones móviles”. Los integrones móviles presentan, en general, casetes de resistencia a antibióticos agrupados en arreglos relativamente pequeños. Los integrones de clase 1 son los más prevalentes en aislamientos clínicos y se hallan frecuentemente asociados con bacilos gram negativos multirresistentes (Di Conza & Gutkind, 2010).

Los integrones clase 1 contienen dos segmentos conservados que flanquean una región central llamada región variable, donde se insertan los genes en casetes. El

segmento 5' conservado (5'CS) incluye al gen *intI1* y el sitio *attI1*. Dentro de esta estructura se encuentran uno o más promotores que aseguran la expresión de los genes integrados. El segmento 3' conservado (3'CS) en general incluye un gen que codifica resistencia a compuestos de amonio cuaternario (*qacEΔ1*), otro de resistencia a sulfonamidas (*sul1*), y un marco de lectura abierto (*orf5*) de función desconocida (Bennett, 2008). El segmento 3'CS es el que se ha encontrado mayormente en integrones caracterizados a partir de aislamiento clínicos, sin embargo existe evidencia de integrones clase 1 que no presentan esta región (Ghaly et al., 2017).

Un gen en casete se compone por dos estructuras funcionales: una secuencia codificante, generalmente carente de promotor propio, flanqueada por secuencias palindrómicas no perfectas que participan activamente de la recombinación específica de sitio. En los casetes de resistencia a antibióticos, esta estructura es conocida como secuencia *attC*. Los más de 130 casetes descritos (Akrami et al., 2019) confieren resistencia a casi todas las familias de antibióticos (β -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprima, sulfamidas, cloranfenicol, rifampicina, lincosaminas, macrólidos, quinolonas) (Di Conza & Gutkind, 2010).

Existe un grupo de integrones que no solo participan en la adquisición y expresión de genes en casetes, sino que además presentan otros elementos que participan en el reclutamiento de genes de resistencia que en este caso no se hallan en forma de casete. Estos integrones inusuales o complejos contienen una copia completa del segmento conservado 5'CS pero presentan dos copias completas o parciales del segmento 3'CS (Hall & Collis, 1998). Entre las dos copias de 3'CS hay una región de 2,1 kb, idéntica en todos los casos, seguida por una región variable que contiene otros genes de resistencia. La secuencia contiene una región común o CR. Los elementos CR son un subgrupo dentro de una familia de secuencias de inserción (IS) por lo que se adoptó el nombre de secuencias de inserción CR (ISCR) (Di Conza & Gutkind, 2010). El elemento ISCR muestra una elevada capacidad para movilizar genes de resistencia como así también transposones compuestos (Le-Vo et al., 2019).

Los integrones no son móviles por sí mismos, pero su asociación con elementos que sí lo son, facilita su transferencia horizontal, lo que explica su amplia difusión entre las bacterias (Partridge, Brown, et al., 2001; Radstrom et al., 1994).

Los integrones de clase 1 inusuales han sido descritos en numerosos estudios como portadores de genes *bla_{CTX-M}* (Casella et al., 2015; Irrgang et al., 2017; Shaikh et al., 2016) y *bla_{CMY-2}* (Naseer et al., 2010).

I.6.2 Transposones y secuencias de inserción

Los transposones (Tn) y las secuencias de inserción (IS) son elementos genéticos transponibles que están involucrados en la movilización y diseminación de genes de resistencia al insertarse en elementos genéticos móviles, como plásmidos (Di Conza & Gutkind, 2010; Partridge et al., 2018). Estos elementos son capaces de insertarse en diferentes sitios de los genomas bacterianos. La gran mayoría de las IS y transposones tienen numerosos posibles sitios de inserción, dependiendo de la estructura o sitio funcional del ADN blanco. Sin embargo, Tn7 es uno de los pocos transposones que tiene preferencia por un solo sitio de inserción en el cromosoma (Craig, 1997). Un transposón se diferencia de un elemento IS en que codifica al menos una función que cambia el fenotipo de la célula de una manera predecible (Figura 7); por ejemplo, un transposón de resistencia confiere resistencia a un antibiótico particular (Bennett, 2008).

Las IS, los transposones compuestos, formados por una región central variable y flanqueada por IS, los transposones de las familias Tn3 y los derivados de Tn402/Tn5090, son los principales tipos de elementos transponibles asociados en la captura y movilización de genes de resistencia a antibióticos en bacilos gram negativos. Estos elementos presentan ciertas similitudes, pero capturan y/o mueven genes por diferentes mecanismos (Partridge, 2011; Radstrom et al., 1994).

Las IS comunes o “clásicas” consisten en elementos móviles formados por secuencias de ADN que codifican para una enzima transposasa (*tnpA*), la cual se encuentra flanqueada por secuencias con repeticiones invertidas (IR), una conocida como IRL (por su ubicación a la izquierda de *tnpA*) y otra IRR (por su ubicación a la derecha *tnpA*) (Partridge, 2011).

También, existen otros tipos de IS, como son elementos tipo-ISEcp1 y los ISCR ya mencionados, los cuales pueden capturar regiones de ADN adyacentes, incluyendo genes de resistencia, y movilizarlos como una unidad (Partridge, 2011; Poirel et al., 2003). Los elementos ISCR son similares a una familia de IS que incluye a IS91, IS801 e IS1294, que se movilizan a través de un mecanismo de replicación en círculo rodante (Garcillan-Barcia & de la Cruz, 2002).

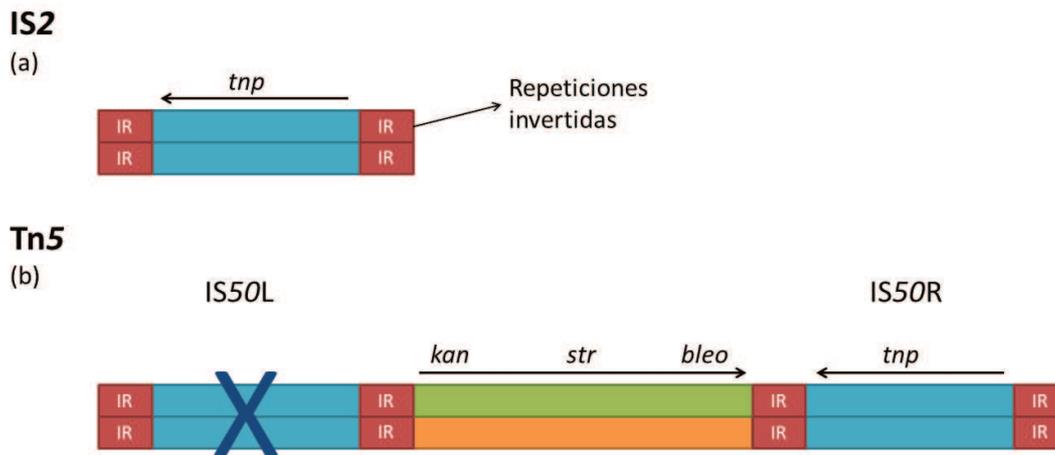


Figura 7: Mapas de los elementos transponibles IS2 y Tn5. Las flechas encima de los mapas indican el sentido de la transcripción de algunos genes de los elementos. El gen que codifica la transposasa es *tnp*. (a) IS2 es una secuencia de inserción con repeticiones invertidas en sus extremos. (b) Tn5 es un transposón compuesto que contiene las secuencias de inserción IS50L e IS50R en los extremos izquierdo y derecho, respectivamente. IS50L no puede realizar la transposición independientemente porque en su gen transposasa hay una mutación sin sentido, marcada por una cruz azul. Los genes *kan*, *str* y *bleo* confieren resistencia a los antibióticos kanamicina, estreptomicina y bleomicina (Figura modificada de Siguier et al. (2014)).

Los transposones compuestos están formados por dos copias de la misma IS común, o dos IS estrechamente relacionadas, y son capaces de capturar genes y movilizarse como una única unidad. Por su parte, la familia de transposones Tn3 incluye dos subgrupos, transposones tipo-Tn3 y tipo-Tn21; ambos están flanqueados por IR de 38 pb e incluyen los genes *tnpA* (codifica para la transposasa) y *tnpR* (codifica para la resolvasa); y un sitio de resolución (*res*). Estos transposones se movilizan por un proceso replicativo que implica el reconocimiento de las IR por parte de la transposasa y la generación de un producto intermedio cointegrado al sitio *res* mediado por la acción de la resolvasa (Partridge, 2011). Como los elementos IS generalmente se pueden encontrar en muchos sitios diferentes, particularmente en diferentes plásmidos, el potencial para mover genes de resistencia mediante este método es considerable (Bennett, 2008).

ISEcp1 es el elemento de inserción más común asociado a los genes *bla*_{CTX-M} y *bla*_{CMY-2} (Partridge et al., 2018) y se ha descrito en una amplia diversidad de genotipos *bla*_{CTX-M} (Zhao & Hu, 2013). ISEcp1 tiene dos características importantes: (i) codifica una transposasa, lo que permite la movilización de los genes de resistencia; y (ii) actúa como un fuerte promotor de la expresión del gen *bla* (Bevan et al., 2017).

I.7 El problema de la resistencia antibiótica

Las infecciones bacterianas representan un grave problema a nivel mundial, dado que los costos de salud asociados son muy elevados, y la emergencia de la resistencia múltiple a antibióticos limita cada vez más el éxito terapéutico; en especial, en infecciones ocasionadas por bacterias gram negativas tales como *Enterobacterales*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa* (Bassetti et al., 2011). Se estima que el impacto económico relacionado con la resistencia a los antimicrobianos costará más de U\$S 105 mil millones anuales en todo el mundo, siendo la regiones menos desarrolladas las que sufrirán el mayor impacto (Codjoe & Donkor, 2017).

En el año 2011, el Día Mundial de la Salud fue dedicado a la resistencia antibiótica bajo el lema “Sin acciones hoy, no hay cura mañana” (*no action today – no cure tomorrow*) demostrando la importancia de esta problemática a nivel mundial y la necesidad de acciones inmediatas para arribar a una solución. En el año 2014, la preocupación de la organización Mundial de la Salud (OMS) por dicha problemática quedó nuevamente expuesta a través de un reporte que indicaba la distribución mundial de la resistencia antibiótica. En dicho reporte el Dr. Keiji Fukuda (Subdirector General de la OMS para Seguridad Sanitaria) expresó la preocupación por la falta de avances en este campo: “*En ausencia de medidas urgentes y coordinadas por parte de muchos interesados directos, el mundo está abocado a una era posantibiótica en la que infecciones comunes y lesiones menores que han sido tratables durante decenios volverán a ser potencialmente mortales*”.

El desarrollo de resistencia a los antimicrobianos está cambiando rápidamente, y el desafío de salud pública es realizar intervenciones coordinadas a nivel mundial para poder mitigar los efectos. Actualmente la OMS colabora estrechamente con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en un enfoque “Una salud” (“*One Health*”) para fomentar las prácticas óptimas que eviten la aparición y propagación de la resistencia a antimicrobianos, y en particular el uso óptimo de los antibióticos tanto en el ser humano como en los animales. El concepto se introdujo para poner nombre a una idea conocida desde hace más de un siglo: la salud humana y la sanidad animal son interdependientes y están vinculadas a los ecosistemas en los cuales coexisten (Una sola salud, 2021).

En los últimos tiempos, se han producido muchas muertes causadas por bacterias resistentes a antibióticos, con una estimación de 25.000 decesos por año a nivel mundial (Codjoe & Donkor, 2017). En respuesta a este contexto el Primer Ministro británico encargó la realización de una revisión que estableció que se prevé

que de no tomar rápidas acciones para cambiar la tendencia actual, las proyecciones para el 2050 estiman una pérdida anual de diez millones de vidas en todo el mundo, causada por estas superbacterias (RT en español, 2014).

Argentina presenta uno de los mayores índices de resistencia a β -lactámicos en los aislamientos de bacilos gram negativos obtenidos de muestras de pacientes intrahospitalarios. Esto se ve reflejado en el estudio publicado por el SENTRY en el cual se analiza la resistencia antibiótica en bacilos gram negativos recuperados entre los años 2008-2010 en los centros hospitalarios participantes del programa de 4 países de Latinoamérica (Brasil, Chile, Argentina y México). En dicho estudio se observó los altos niveles de resistencia a carbapenemes y CTG de los aislamientos circulantes en nuestro país (Gales et al., 2012). Esta tendencia sigue en aumento de acuerdo a lo observado en los relevamientos realizados por Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) donde se evidencia un incremento año a año en los porcentajes de resistencia de *Enterobacterales* a varios grupos de antimicrobianos, donde se destacan principalmente las CTG (ReLAVRA-OPS, s.f.).

Las bacterias pueden volverse resistentes a la acción de los antibióticos gracias a diferentes mecanismos, como ser las mutaciones puntuales, la modificación del blanco o sitio diana de acción del compuesto, la hidrólisis del antimicrobiano, impermeabilidad, a través de bombas de eflujo, como también la adquisición de elementos genéticos a través de mecanismos de intercambio génico que contribuyen a la rápida diseminación de la resistencia antibiótica (Habboush & Guzman, 2020).

Dichos mecanismos pueden transferirse entre bacterias de un mismo género o especie como así también entre bacterias de géneros o especies diferentes. Esto ha favorecido y sigue jugando un papel central en la emergencia de patógenos multirresistentes.

Sin dudas, el tratamiento de las infecciones con antibióticos ha sido un hito que revolucionó la medicina, pero también es cierto que el uso de antibióticos es el factor más importante que lleva a la aparición de resistencia. En el contexto actual donde se observa una creciente prevalencia en la resistencia a CTG y a otros grupos antimicrobianos en aislamientos clínicos, el mal uso y en algunos casos el abuso de antibióticos, resulta indispensable implementar sistemas de vigilancia epidemiológica que permitan detectar y caracterizar los mecanismos de resistencia y los vehículos responsables de su diseminación prevalentes en la región, de manera tal de poder reducir su impacto sobre la salud pública, sobre todo ante la falta de políticas efectivas que regulen la utilización desmedida de antibióticos.

I.8 Justificación del estudio e hipótesis

I.8.1 Justificación del Estudio

Aplicando los actuales puntos de corte para CTG y criterios de interpretación propuestos por el CLSI, que no contemplan la epidemiología local con respecto al mecanismo de resistencia a CTG (BLEE, AmpCp, carbapenemasas), o que no promueven el reconocimiento de estas enzimas, se puede derivar en elecciones inadecuadas de tratamiento antibiótico, ya sea por ser poco efectivos para el paciente incrementando el riesgo de fallas terapéuticas o por recurrir a antimicrobianos de reserva cuando no es necesario.

La relación costo/efectividad de los tratamientos antimicrobianos de las infecciones producidas por bacterias resistentes, aumenta inevitablemente por las fallas en el tratamiento, lo cual implica una prolongación del tiempo de internación del paciente y un incremento de los costos asociados al tratamiento alternativo y a los estudios diagnósticos adicionales. Por otra parte, la elección de drogas de reserva para un tratamiento infeccioso tiene que ser tomada con un criterio holístico teniendo en cuenta que su uso masivo inevitablemente conduce a la selección de organismos resistentes limitando así los recursos terapéuticos disponibles para el tratamiento de infecciones producidas por microorganismos multiresistentes. Los resultados de este trabajo permitirán conocer los mecanismos de resistencia presentes en la ciudad de Santa Fe y su zona de influencia, particularmente de aquellos implicados en la resistencia a CTG. También analizará el comportamiento de los aislamientos con resistencia disociada a CTG frente a varios antimicrobianos y permitirá conocer la asociación de los mecanismos involucrados con elementos móviles capaces de su diseminación. En síntesis, este trabajo contribuirá al conocimiento del escenario epidemiológico local de resistencia a CTG y brindará herramientas para evaluar el impacto de los actuales puntos de corte y criterios de interpretación emitidos por el CLSI.

I.8.2 Hipótesis

Dado lo comentado hasta aquí, la hipótesis general de este trabajo es que los aislamientos locales de *Enterobacterales* resistentes a CTG presentan diferentes mecanismos que, dependiendo de la especie bacteriana, del marcador presente y su contexto genético, tendrían diferente respuesta *in vitro* según el antibiótico (CTG) potencialmente seleccionado para el tratamiento de un paciente de acuerdo al perfil de sensibilidad observado para dicho antibiótico.

Por todo lo expuesto anteriormente, a continuación se enuncian el objetivo general y los objetivos específicos de esta tesis.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo de tesis se centró en analizar las β -lactamasas presentes en enterobacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación (BLEE, AmpC y carbapenemasas), describir los mecanismos asociados al fenotipo de resistencia disociada a CTG, evaluar su comportamiento *in vitro* frente a diferentes antibióticos y caracterizar distintos aspectos relacionados a los plásmidos que portan los genes involucrados.

Objetivos específicos

- Identificar los mecanismos de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *Enterobacterales* aislados en Santa Fe durante un período de tiempo determinado.
- Detectar los aislamientos resistentes a carbapenemes dentro del total de enterobacterias analizadas e identificar los mecanismos causales de tal resistencia.
- Evaluar los mecanismos de resistencia involucrados en los aislamientos con resistencia disociada entre las cefalosporinas de tercera generación.
- Evaluar el comportamiento de los diferentes marcadores de resistencia asociados al fenotipo disociado frente a ceftazidima, cefotaxima, cefepime y combinaciones de cefalosporinas de tercera generación con aminoglucósidos mediante curvas de cinética de muerte o letalidad.
- Cuantificar la cantidad de plásmidos presentes en los aislamientos estudiados y estimar su tamaño.
- Clasificar los plásmidos encontrados, según su capacidad de diseminación entre células (conjugativos o movilizables), su grupo de incompatibilidad y de acuerdo a la relaxasa tipo MOB que codifiquen.
- Determinar la presencia de los distintos sistemas de adicción presentes en plásmidos de resistencia.
- Determinar los entornos genéticos de alguno de los mecanismos de resistencia encontrados en las enterobacterias estudiadas y evaluar su asociación a plataformas génicas de movilización.

CAPÍTULO 1

Resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *Enterobacterales*

CAPÍTULO 1: Resistencia a cefalosporinas de tercera generación en *Enterobacterales*

INTRODUCCIÓN

1.1 Inactivación enzimática de los antibióticos β -lactámicos por β -lactamasas

Las β -lactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo β -lactámico de penicilinas, cefalosporinas y otros β -lactámicos, perdiendo capacidad de unión a las PBP, y dando así lugar a compuestos sin actividad antibacteriana. Desde un punto de vista clínico es esencial conocer la identidad del microorganismo que produce la β -lactamasa, la localización del gen productor de la enzima (plásmido o cromosoma), el carácter inducible o constitutivo de su expresión y el fenotipo de resistencia que determina. Las β -lactamasas pueden clasificarse según su secuencia aminoacídica (clasificación de Ambler), sobre todo en su sitio activo, en cuatro clases A, B, C, y D (Ambler, 1980). Las enzimas de clase A, C y D poseen serina en su centro activo, que reacciona con el anillo β -lactámico, abriéndolo irreversiblemente e inactivando el antibiótico; mientras que las enzimas de clase B poseen Zinc en su centro activo (metalo- β -lactamasas), que reacciona con el grupo carbonil del enlace amida del β -lactámico inactivándolo. Otra forma de clasificación para estas enzimas es la propuesta por Bush, Jacoby y Medeiros en 1995 (Bush et al., 1995), la cual fue actualizada en el año 2010 (Bush & Jacoby, 2010) y revisada en 2013 (Bush, 2013). La misma es una clasificación funcional basada en los sustratos y los perfiles de inhibición de cada enzima. De esta manera, las diferentes β -lactamasas se ubican en grupos (1, 2, 3, etc.) y en subgrupos (2a, 2b, 2c, etc.). En la tabla 2 se detallan los grupos de β -lactamasas más relevantes de acuerdo con ambas clasificaciones.

Tabla 2: Clasificación de β -lactamasas (Tabla modificada de Sawa et al. (2020)).

	Bush, Jacoby y Medeiros	Ambler	Enzimas
Grupo 1*	Cefalosporinasas	C	AmpC inducibles y constitutivas Plasmídicas (CMY, MIR, MOX, FOX, DHA y ACT)
Grupo 2**	Serino- β -lactamasas	A y D	BLEE (TEM, SHV, CTX-M) Oxacilinasas (OXA) Carbapenemasas (KPC, GES, SME)
Grupo 3***	Metalo- β -lactamasas	B	Metalo- β -lactamasas (VIM, IMP SPM, NDM)

*Presentan serina en el sitio activo. No son inhibidas por ácido clavulánico

**Presentan serina en el sitio activo. Son inhibidas por ácido clavulánico

***Presentan zinc en el sitio activo. No son inhibidas por ácido clavulánico

1.1.1 β -lactamasas cromosómicas

La gran mayoría de las bacterias gram negativas poseen una β -lactamasa cromosómica, que se expresa generalmente en muy poca cantidad, no confiriendo resistencia. Algunas especies, como *E. coli*, puede incrementar de forma constitutiva la síntesis de esta enzima (en este caso de tipo AmpC) y, según su grado de expresión, se puede producir resistencia a todas las penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación (incluida cefoxitina) y a algunas de tercera generación como ceftazidima, mientras que permanecen sensibles a cefalosporinas de cuarta generación y carbapenemes (Livermore, 1995).

La expresión de la β -lactamasa cromosómica tipo AmpC en otros *Enterobacterales* como *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella* spp. y en *P. aeruginosa* es de carácter inducible. Este proceso de inducción por el cual se incrementa la síntesis de la enzima cuando la bacteria está en presencia del antibiótico inductor es un fenómeno reversible que desaparece cuando este no está presente (Jacoby, 2009). Además, se pueden producir fenómenos de desrepresión, que también incrementan la cantidad de β -lactamasa. A diferencia de la inducción, la desrepresión es un fenómeno irreversible, que no desaparece cuando la bacteria no está en presencia del antibiótico inductor, sino que se seleccionan mutantes desreprimidas que sintetizan gran cantidad de enzima. Este proceso genera resistencia a las penicilinas y a las CTG (Livermore, 1995).

Desde un punto de vista clínico, el fenómeno de la desrepresión puede suponer un fracaso terapéutico, que puede desarrollarse durante el tratamiento con β -lactámicos. Aislamientos de *Enterobacter* spp. y *P. aeruginosa* pueden hiperproducir la β -lactamasa tipo AmpC. Por lo que, en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias portadoras de β -lactamasas cromosómicas inducibles se recurre a la administración de β -lactámicos poco selectores como carbapenemes o cefalosporinas de cuarta generación, que presentan menor tasa de hidrólisis por parte de estas enzimas, y un bajo carácter selector, o a la administración simultánea de un antibiótico β -lactámico con un aminoglucósido (Jacoby, 2009).

El carácter inducible de estas enzimas es fácilmente detectable en la técnica de difusión con discos. Cuando se disponen los discos de cefoxitina o imipenem próximos a los de las cefalosporinas de tercera o cuarta generación puede observarse un antagonismo entre ambos antibióticos. Esto es el resultado de la inducción de las β -lactamasas que ejercen los antibióticos inductores (Navarro et al., 2010).

En ningún caso las enzimas cromosómicas tipo AmpC son sensibles a la acción de los inhibidores clásicos de β -lactamasas. En cambio, las β -lactamasas de

Klebsiella spp. y *Proteus vulgaris* son sensibles al ácido clavulánico y otros inhibidores de β -lactamasas como sulbactam y tazobactam. Las primeras, representadas por LEN-1 o SHV-1 en *K. pneumoniae* o K1 en *Klebsiella oxytoca*, se expresan de forma constitutiva; sin embargo, la β -lactamasa cromosómica de *P. vulgaris* es de carácter inducible y, al igual que AmpC de *E. cloacae* o *P. aeruginosa*, pero con menor frecuencia, se pueden seleccionar durante el tratamiento, mutantes que hiperproducen la enzima (Livermore, 1995).

1.1.2 β -lactamasas plasmídicas

Las primeras β -lactamasas plasmídicas que se describieron fueron las encontradas en *S. aureus* poco tiempo después de introducirse la penicilina en la terapia clínica. En las bacterias gram negativas las β -lactamasas plasmídicas están ampliamente difundidas, aunque su incidencia depende de la especie. La gran mayoría de estas β -lactamasas no son inducibles y su producción o hiperproducción se debe a la presencia de los genes *bla* en plásmidos multicopia, o bien porque están asociadas a promotores que inducen una elevada expresión. A su vez, los genes *bla* pueden estar vinculados a integrones o secuencias de inserción que aportan este tipo de promotores (Livermore, 1995).

Las β -lactamasas tipo AmpC plasmídicas son el resultado de la incorporación de genes cromosómicos en plásmidos. Esto ha dado lugar a β -lactamasas plasmídicas con un perfil de sustrato similar a la enzima de la que proceden, con una excepción, no son inducibles. La salvedad es la enzima ACT-1, la única β -lactamasa plasmídica inducible entre bacterias gram negativas (Bradford et al., 1997).

La presión ejercida por el uso de las CTG ha determinado que algunas enzimas plasmídicas clásicas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, sufran mutaciones en su centro activo. Con ello se modifica también el perfil de sustrato y se produce la hidrólisis de los β -lactámicos de amplio espectro, las CTG, los monobactámicos y, en menor medida, las cefalosporinas de cuarta generación. Sin embargo, conservan la sensibilidad a cefoxitina, carbapenemes e inhibidores de β -lactamasas. Las enzimas resultantes de este proceso adaptativo, llamadas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) surgieron en Europa entre los años 1983 y 1988 (Philippon et al., 1989).

1.2 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

1.2.1 Introducción e historia

En el año 1940 fue descrita la primera β -lactamasa, se observó que un aislamiento de *E. coli* no era inhibido por la penicilina en un cultivo *in vitro* (Abraham &

Chain, 1940). Más adelante, en la década del 60, se describió la primera β -lactamasa codificada en un plásmido en una bacteria gram negativa. Fue encontrada en un aislamiento de *E. coli* procedente de un hemocultivo de una paciente llamada “Temoniera” en Grecia, lo que dio origen a la designación de la enzima como TEM (Datta & Kontomichalou, 1965). El hecho de que esta enzima esté mediada por plásmidos y transposones ha facilitado el paso de la misma a otras especies bacterianas. Así, años después de este primer aislamiento, la β -lactamasa TEM-1 puede encontrarse en múltiples especies del orden *Enterobacterales*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*.

Otra β -lactamasa, comúnmente encontrada en *K. pneumoniae* es SHV-1 (de “sulphydryl variable”). SHV-1 está codificada por el cromosoma en la mayoría de los aislamientos de *K. pneumoniae*, pero usualmente es de origen plasmídico en otras especies tales como *E. coli* (Livermore, 1995). Tanto TEM-1 como SHV-1 son consideradas paradigmas de las β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA).

En los últimos 30 años se han incorporado nuevos β -lactámicos para el tratamiento clínico de infecciones. Sin embargo, con cada nuevo antibiótico usado en la terapia de pacientes, nuevas β -lactamasas han aparecido causando resistencia a estos nuevos grupos de fármacos (Habboush & Guzman, 2020). Presumiblemente, la presión selectiva producida por el uso de nuevos antibióticos en el tratamiento de las infecciones ha seleccionado nuevas variantes de β -lactamasas. Una de estas nuevas clases de antibióticos han sido las oximiino-cefalosporinas (o CTG), que desde la década de los 80 comenzaron a extender su uso para el tratamiento de las infecciones graves por bacterias gram negativas (Arumugham & Cascella, 2020; Bui & Preuss, 2020).

La primera descripción de un aislamiento portador de una β -lactamasa plasmídica, con un perfil de resistencia a CTG y sensible a cefoxitina, se realizó en Europa, puntualmente en Alemania (Knothe et al., 1983). Posteriormente, se demostró que la resistencia era debida a la producción de una β -lactamasa plasmídica transferible derivada de SHV-1 y que se denominó SHV-2 (Kliebe et al., 1985). Debido al incremento de espectro de β -lactámicos hidrolizados, especialmente oximiino-cefalosporinas, estas enzimas se denominaron “ β -lactamasas de espectro extendido” (BLEE), por hidrolizar un rango de β -lactámicos más amplio que las enzimas plasmídicas TEM-1, TEM-2 y SHV-1 (Philippon et al., 1989). Las BLEE están distribuidas por todo el mundo y se encuentran principalmente en diferentes especies de *Enterobacterales* y bacilos gram negativos no fermentadores.

Las BLEE están codificadas mayormente en plásmidos (Jacoby & Sutton, 1991). La mayoría de ellas pertenecen a la clase molecular A de la clasificación de Ambler, y entre sus características principales encontramos que poseen el aminoácido serina en su centro activo, tienen un peso molecular que ronda los 28 - 29 kDa (Medeiros et al., 1988). Utilizando el esquema propuesto por Bush, Jacoby y Medeiros (Bush et al., 1995) las BLEE son definidas como β -lactamasas capaces de hidrolizar oxiiimino-cefalosporinas, son inhibidas por ácido clavulánico y quedan incluidas en el grupo funcional 2be de esta clasificación.

1.2.2 Tipos de BLEE

Muchas de las BLEE derivan de las enzimas TEM o SHV, aunque no todas. Mutaciones puntuales en el gen que las codifica incrementan el espectro de hidrólisis hacia CTG. Las BLEE se encuentran fundamentalmente en *E. coli* y *K. pneumoniae*, sin embargo, también se han descrito en otros géneros de *Enterobacterales* y bacilos gram negativos no fermentadores (Bradford, 2001).

1.2.2.1 β -lactamasas tipo TEM

La expresión de la β -lactamasa TEM-1 fue el mecanismo más común de resistencia a las aminopenicilinas y cefalosporinas de 1 generación (como cefalotina) entre las bacterias gram negativas en todo el mundo. Este mecanismo de resistencia ha sido ampliamente descrito en *Enterobacterales*, pero no está confinado sólo a este grupo de bacterias (Bradford, 2001).

TEM-2, es la primera enzima derivada de TEM-1 y presenta una única sustitución, la de glutamina en la posición 39 a lisina respecto a la secuencia de TEM-1. Esto produce cambios en el punto isoeléctrico, pero no modifica el perfil de hidrólisis del sustrato. La prevalencia de TEM-2 entre plásmidos en enterobacterias resistentes a β -lactámicos no supera el 4% (Bradford, 2001). TEM-3, originalmente descrita en 1988, fue la primera β -lactamasa tipo TEM que mostró un fenotipo propio de una BLEE (Sougakoff et al., 1988).

Las sustituciones en los aminoácidos que ocurren en la secuencia de la enzima TEM se producen en un número limitado de posiciones. Los cambios de glutamina por lisina en la posición 102 y glicina por serina en la posición 236 produce la aparición del fenotipo de BLEE, que origina la capacidad de hidrolizar CTG, o cambios en el punto isoeléctrico.

La presión ejercida por el uso de las cefalosporinas hizo que se vayan seleccionando nuevas enzimas como consecuencia de mutaciones sucesivas en la

secuencia de aminoácidos, para ir creando enzimas cada vez más eficaces en la hidrólisis de las cefalosporinas (Bradford, 2001).

1.2.2.2 β -lactamasas tipo SHV

La β -lactamasa SHV-1 se encuentra principalmente en *K. pneumoniae* y por lo general el gen *bla_{SHV}* se localiza integrado en el cromosoma bacteriano (Livermore, 1995). La secuencia nucleotídica de este gen comparte un 65% de identidad con el gen de TEM-1 (Huletsky et al., 1990).

A diferencia de las β -lactamasas tipo TEM, existen relativamente pocas β -lactamasas derivadas de SHV-1. La mayor parte de las variantes SHV poseen un fenotipo de BLEE que está generado por la sustitución de un aminoácido serina en lugar de glicina en la posición 238 de su secuencia. Esta mutación está asociada con una mayor actividad sobre cefotaxima y un incremento moderado sobre ceftazidima respecto a lo observado en SHV-1 (Bradford, 2001). La mayor parte de las enzimas SHV poseen un fenotipo de BLEE. Sin embargo, la variante SHV-10 tiene un fenotipo de β -lactamasa resistente a inhibidores de β -lactamasas.

La mayor parte de BLEE tipo SHV se han encontrado en aislamientos de *K. pneumoniae*; sin embargo, también han sido descritas en *Citrobacter koseri*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (Liakopoulos et al., 2016).

1.2.2.3 β -lactamasas tipo CTX-M

Estas β -lactamasas fueron descritas por primera vez en el año 1989 (Bauernfeind et al., 1990), pero adquirieron relevancia sobre otras BLEE a partir del año 2000, donde se comenzó a observar una enorme evolución y una muy elevada dispersión de las mismas. Tal es así, que los aislamientos productores de CTX-M no estaban solamente confinados al ambiente hospitalario, sino también en la comunidad (Canton et al., 2012).

La familia de β -lactamasas tipo CTX-M constituye un complejo y heterogéneo grupo de enzimas. El análisis de las secuencias aminoacídicas de las diferentes variantes permitió clasificar a estas β -lactamasas en 5 grupos. A su vez, a partir de análisis filogenéticos se sugiere que las enzimas CTX-M derivan de genes cromosómicos de *Kluyvera* spp., que fueron capaces de incorporarse a elementos genéticos móviles (Canton et al., 2012).

Por lo general, las β -lactamasas tipo CTX-M afectan en mayor grado a la cefotaxima que a la ceftazidima, pero la presión selectiva y mutaciones puntuales en

su secuencia le dieron la posibilidad de mejorar la actividad hidrolítica contra ceftazidima permitiendo la aparición de nuevas variables (Poirel et al., 2008).

Desde su aparición, se ha observado que las enzimas CTX-M han desplazado a otras BLEE en *Enterobacterales*, incluyendo a las variantes de TEM y SHV (Bevan et al., 2017). Este desplazamiento pudo haber sucedido no solo por la facilidad de dispersión de los genes *bla*_{CTX-M} mediante plataformas génicas altamente movilizables (plásmidos y transposones principalmente), sino también gracias a clones exitosos (Woodford et al., 2011). Otra posible explicación está basada en el fenómeno de co-resistencia en aislamientos productores de CTX-M, donde también se observa resistencia a otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos y fluoroquinolonas, lo que favorecería la selección (Canton & Ruiz-Garbajosa, 2011).

Desde su surgimiento, es posible distinguir tres periodos diferentes. En el primero, se produce hasta mediados de la década del 90, donde se da la aparición de diferentes β-lactamasas CTX-M en áreas geográficas diferentes y distantes. El segundo, está caracterizado por la aparición de las enzimas más extendidas a nivel mundial, donde se encuentran CTX-M-15, CTX-M-14, CTX-M-3 y CTX-M-9, lo que ocurrió entre los años 1994 y 2000. Finalmente, tenemos el tercer periodo, que comienza alrededor del año 2000 y se caracteriza por la dispersión global de estas BLEE (Canton et al., 2012). En la figura 8 se muestra la distribución global observada hasta el año 2009 de las diferentes BLEE tipo CTX-M.

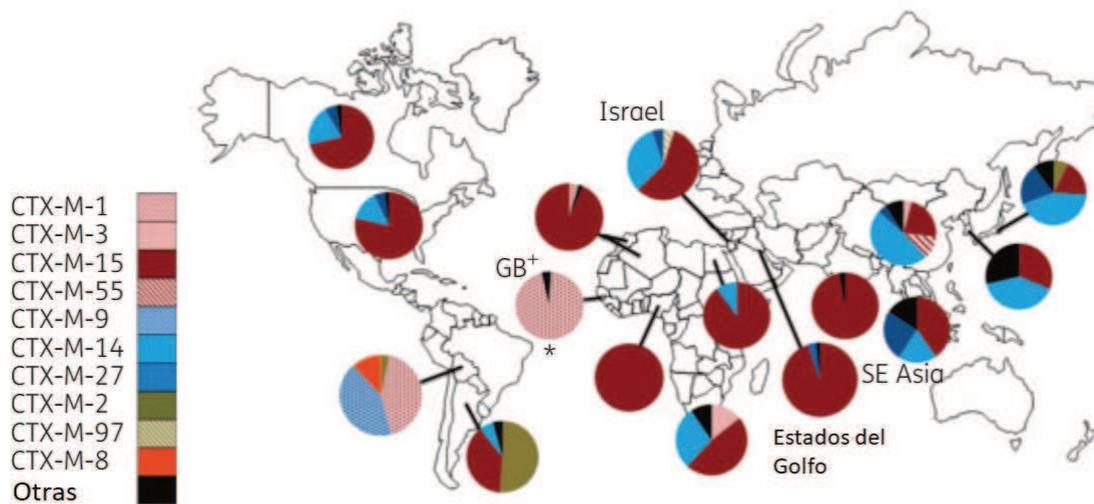


Figura 8: Distribución de enzimas CTX-M para el año 2009. Se incluyen aislamientos comunitarios y hospitalarios. Un asterisco indica que, para estas áreas, solo se realizó el agrupamiento CTX-M y estos no se subdividieron en genotipos. Nota: Muchos países no tienen datos publicados para ciertos periodos de tiempo. El sudeste (SE) de Asia incluye Camboya, Indonesia, Malasia, Filipinas, Taiwán y Vietnam. Los Estados del Golfo incluyen Kuwait, Arabia Saudita y Emiratos Árabes Unidos. GB: Guinea-Bissau. Actualmente en Argentina CTX-M-15 es la BLEE más prevalente. Los tonos de color representan los grupos CTX-M (Figura modificada de Bevan et al. (2017)).

Los primeros reportes de este tipo de enzimas se dieron de manera simultánea en Europa y en América de Sur. En Munich (Alemania) durante 1989 fue informado un aislamiento de *E. coli* que mostró un perfil de resistencia a cefotaxima y sensibilidad a ceftazidima el cual fue caracterizado como portador de una BLEE tipo CTX-M (Bauernfeind et al., 1990). La enzima responsable de este fenotipo fue nombrada como CTX-M-1 ("CTX" por su actividad hidrolítica preferencial por cefotaxima y "M" por Munich). Por otro lado, en Argentina, se realizó la caracterización de un aislamiento de *Salmonella* Typhimurium que mostró un perfil de cefotaximasa (Bauernfeind et al., 1992). En este caso, la enzima responsable de este fenotipo fue denominada como CTX-M-2. En los años siguientes fueron descritas nuevas variantes tales como CTX-M-9 (Sabate et al., 2000), CTX-M-10 (Oliver et al., 2001), CTX-M-31 (Quinteros et al., 2003), así como las enzimas Toho-1 (Ishii et al., 1995) y Toho-2 (Ma et al., 1998), las cuales fueron renombradas posteriormente como CTX-M-44 y CTX-M-45 respectivamente (Canton et al., 2012). A partir del primer aislamiento productor de CTX-M-2, esta enzima se convirtió en la BLEE de mayor prevalencia en nuestro país hasta que en la última década ha sido desplazada por CTX-M-15 (Sennati et al., 2012), una de las BLEE de mayor distribución a nivel mundial (Peirano & Pitout, 2019).

La aparición de esta gran familia de β -lactamasas en zonas geográficas comunes y distantes (Europa Central, América del Sur y Japón) puede deberse a la enorme presión selectiva generada por el uso indiscriminado de antibióticos β -lactámicos. Por otro lado, prácticamente no existen relevamientos epidemiológicos realizados a finales de la década del 80 en la región del Sureste Asiático, por lo que no se dispone de toda la información necesaria para comprender con exactitud cómo se produjo la difusión de estas enzimas (Canton et al., 2012).

Las enzimas CTX-M se agrupan en base a las similitudes en las secuencias de aminoácidos en cuatro grupos filogenéticos principales: CTX-M grupo 1 (en este grupo se encuentra CTX-M-15), CTX-M grupo 2 (CTX-M-2 es la BLEE perteneciente a este grupo de mayor prevalencia en nuestro país), CTX-M grupo 8/25 y CTX-M grupo 9 (donde CTX-M-14 es la de mayor distribución mundial) (Bevan, et al., 2017).

En la tabla 3 se resumen las primeras descripciones de las principales enzimas CTX-M.

Tabla 3: Primeras descripciones de enzimas CTX-M a nivel mundial.

Año	País	CTX-M	Grupo	Especie	Referencia
1989	Alemania	CTX-M-1	1	<i>E. coli</i>	(Bauernfeind et al., 1990)
1989	Argentina	CTX-M-2	2	<i>S. Typhimurium</i>	(Bauernfeind et al., 1992)
1993	Japón	CTX-M-44*	2	<i>E. coli</i>	(Ishii et al., 1995)
1996	Polonia	CTX-M-3	1	<i>C. freundii</i>	(Gniadkowski et al., 1998)
1994	Francia	CTX-M-9	9	<i>E. coli</i>	(Saladin et al., 2002)
1996	Corea	CTX-M-14	9	<i>Shigella sonnei</i>	(Pai et al., 2001)
1998	Polonia	CTX-M-15	1	<i>S. marcescens</i>	(Baraniak et al., 2002)
1996	Brasil	CTX-M-8	8	<i>E. cloacae</i>	(Bonnet et al., 2000)
2000	Canadá	CTX-M-25	25	<i>E. coli</i>	(Munday et al., 2004)

* Inicialmente nombrada como Toho-1

1.2.2.4 Otras BLEE

Existen otras BLEE que no han podido clasificarse dentro de ninguna de las familias típicas descritas hasta ahora. Tal es el caso de la β -lactamasa PER-1. Fue por primera vez descrita en *P. aeruginosa*, aislada en Turquía (Nordmann, Ronco, et al., 1993).

Por su parte, la enzima PER-2, con un 86% de similitud genética con la enzima PER-1, ha sido descrita en *S. Typhimurium* en Argentina (Bauernfeind, Stemplinger, Jungwirth, Mangold, et al., 1996). PER-2 es una BLEE que ha sido detectada casi exclusivamente de Sudamérica (Bradford, 2001).

1.3 β -lactamasas tipo AmpC

1.3.1 Introducción e historia

La primera enzima capaz de inactivar la penicilina descubierta en 1940 en *E. coli* era una β -lactamasa de tipo AmpC, aunque en ese momento no había recibido ese nombre (Abraham & Chain, 1940).

Las AmpC son serino- β -lactamasas pertenecientes al grupo 1 de la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros (Bush et al., 1995) y a la clase C de la clasificación de Ambler (1980). Son también llamadas cefalosporinas aunque su espectro de acción hidrolítica no sólo incluya cefalosporinas.

Ciertas bacterias pertenecientes al orden *Enterobacterales* poseen de manera natural β -lactamasas tipo AmpC, tal es el caso de *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *S. marcescens*, *C. freundii* y *Hafnia alvei*. En estos microorganismos las AmpC producidas son de naturaleza cromosómica inducible y explican la resistencia natural a las aminopenicilinas, cefalosporinas de primera generación y segunda generación y aminopenicilinas combinadas con inhibidores

clásicos de β -lactamasas. *E. coli* y *Shigella* spp. también poseen β -lactamasas AmpC cromosómicas pero constitutivas (no inducibles). Una de las características de las enzimas AmpC es que no tienen efecto sobre cefalosporinas de cuarta generación, ni sobre carbapenemes y a su vez, no son inhibidas por inhibidores clásicos de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam) (Martínez Rojas, 2009).

Los aislamientos productores de AmpC de codificación plasmídica se comenzaron a descubrir y caracterizar a partir del año 1989 (Bauernfeind et al., 1989). Desde ese momento los genes AmpC plasmídicos han sido detectados en todo el mundo ya sea en aislamientos de origen intrahospitalario como comunitarios (Bauernfeind, Stemplinger, Jungwirth, & Giamarellou, 1996; Bradford et al., 1997; Girlich, Naas, et al., 2000; Gonzalez Leiza et al., 1994; Jacoby, 2009).

1.3.2 Tipos de AmpC

1.3.2.1 AmpC cromosómicas

Las enzimas AmpC cromosómicas pueden ser inducibles o constitutivas. Las AmpC inducibles se caracterizan por producir bajos niveles de manera natural y aumentan su síntesis en presencia de inductores (cefalosporinas de primera generación, cefoxitina e imipenem principalmente). También pueden desreprimirse perdiendo la propiedad de inducción. Son ejemplos de bacterias portadoras de AmpC inducibles *Enterobacter* spp., *M. morgani*, *Providencia* spp. Las enzimas AmpC cromosómicas no inducibles (constitutivas), presentan niveles muy bajos de expresión sin mostrar resistencia en los aislamientos portadores. Cuando se encuentran hiperproducidas pueden conferir resistencia a todos los β -lactámicos a excepción de cefalosporinas de cuarta generación y carbapenemes. La bacteria representativa de este grupo es *E. coli* (Martínez Rojas, 2009).

1.3.2.2 AmpC plasmídicas

La evidencia molecular sugiere que los genes que codifican a las enzimas AmpC plasmídicas, derivan de los genes *ampC* cromosómicos que naturalmente poseen ciertas especies de *Enterobacterales*. Estos genes han sido integrados en elementos genéticos transferibles facilitando su diseminación a diferentes microorganismos (Philippon et al., 2002). Los genes *ampC* de locación plasmídica han sido encontrados en múltiples zonas geográficas y en diferentes especies bacterianas que naturalmente no poseen estos genes en su cromosoma (Jacoby, 2009). Se han descrito más de 20 familias de AmpC plasmídicas entre las cuales se destacan: ACC, FOX, MOX, DHA, CIT (incluyen tipo CMY) y EBC (Martínez Rojas, 2009). La enzima

AmpC plasmídica más difundida es CMY-2 y tiene su origen en el cromosoma de *C. freundii* (Bauernfeind, Stemplinger, Jungwirth, & Giamarellou, 1996).

Al igual que las β -lactamasas AmpC cromosómicas hiperproducidas, las enzimas AmpC plasmídicas confieren resistencia a un amplio espectro de β -lactámicos incluyendo penicilinas, CTG, cefoxitina y, de manera variable, al aztreonam (Martínez Rojas, 2009). Se ha determinado que el nivel de expresión de ciertas AmpC plasmídicas inducibles es mucho mayor en comparación con las AmpC cromosómicas inducibles; como ejemplo, la AmpC plasmídica inducible ACT-1 tiene un nivel de expresión de 33 a 95 veces mayor que el de la AmpC cromosómica inducible de *E. cloacae*. Esto es debido, en parte, al mayor número de copias de genes codificantes de ACT-1 (Reisbig et al., 2003).

Por lo general, las AmpC plasmídicas son de expresión constitutiva y confieren patrones de resistencia semejantes a los observados en AmpC cromosómicas desreprimidas (Meini et al., 2019).

Los genes *ampC* han sido asociados a diversos plásmidos, los cuales varían en tamaño de 7 a 180 Kb, y a su vez, parte de estos plásmidos son conjugativos o movilizables (Philippon et al., 2002). Además, los plásmidos portadores de β -lactamasas AmpC frecuentemente están asociados a marcadores que confieren resistencia a otros antibióticos tales como: aminoglucósidos, cloranfenicol, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina y trimetoprima, como así también, pueden expresar otras β -lactamasas como es el caso de TEM-1, CTX-M-3, SHV y VIM-1 (Jacoby, 2009).

Las principales especies dentro del orden *Enterobacterales* que han sido reportados por adquirir AmpC plasmídicas incluyen a *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*, como así también *K. oxytoca*, *S. enterica* y *Shigella* spp. (Meini et al., 2019).

1.4 Carbapenemasas

1.4.1 Introducción e historia

Las carbapenemasas fueron conocidas desde la introducción del imipenem en 1980 en *Bacillus cereus* (Lim et al., 1988), *Bacteroides fragilis* (Carfi et al., 1998) y *Stenotrophomonas maltophilia* (Walsh et al., 1994). Desde su descubrimiento en bacterias de interés clínico en Japón en los años 90 (Minami et al., 1996), en *S. marcescens* en Reino Unido (Yang et al., 1990) y *E. cloacae* en Francia (Nordmann, Mariotte, et al., 1993), las carbapenemasas han ido aumentando su prevalencia e interés, principalmente por su significado e impacto clínico.

En el año 2001 se notificó en los Estados Unidos un aislamiento de *K. pneumoniae* que portaba un gen codificante de carbapenemasa de locación

plasmídica, el producto de este gen era una proteína que se denominó como KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) (Yigit et al., 2001). Desde entonces el gen *bla*_{KPC} se ha extendido ampliamente en todo el continente americano y los brotes de *Enterobacterales* productores de KPC son reportados periódicamente en la mayoría de las regiones europeas (Munoz-Price et al., 2013). Las infecciones causadas por organismos productores de KPC tienen opciones de tratamiento muy limitadas y se asocian con malos resultados clínicos y alta morbi-mortalidad (Hammoudi Halat & Ayoub Moubareck, 2020).

De acuerdo a la clasificación actualizada de Bush, Jacoby y Medeiros, las carbapenemasas se clasifican en los grupos 2df, 2f, 3a y 3b (Bush & Jacoby, 2010). Según la clasificación molecular de Ambler, estas enzimas se agrupan en las clases A (KPC), B (metalo- β -lactamasas) y D (oxacilinasas) (Ambler, 1980). Actualmente, las metalo- β -lactamasas se dividen en tres subclases (B1, B2 y B3) basadas en la combinación de características estructurales, la afinidad del zinc para los dos sitios de unión y el perfil de hidrólisis (Frere et al., 2005).

Las carbapenemasas representan la familia de β -lactamasas más versátil, con un amplio espectro. Aunque se conocen como “carbapenemasas”, la mayoría de estas enzimas reconocen e hidrolizan a casi todos los β -lactámicos y son resistentes a la acción de los inhibidores clásicos de β -lactamasas (Hammoudi Halat & Ayoub Moubareck, 2020).

Las carbapenemasas han sido principalmente aisladas en *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Dentro de las enterobacterias, estas enzimas se aíslan principalmente en *K. pneumoniae* y en menor medida en *E. coli* y otras especies, con una prevalencia más alta en el sur de Europa y Asia que en otras partes del mundo. KPC es la carbapenemasa más común y prevalente en China, Estados Unidos, Italia y la mayoría de los países de América del Sur, mientras que, NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*) prevalece principalmente en China, Pakistán, India y Bangladesh, aunque se ha extendido a todo el mundo (Cui et al., 2019).

1.4.2 Tipos de carbapenemasas

1.4.2.1 Carbapenemasas KPC

Pertencen a la clase de A de la clasificación de Ambler (1980) y al grupo 2f del esquema actualizado de Bush, Jacoby y Medeiros (Bush & Jacoby, 2010). Son β -lactamasas de codificación plasmídica y el gen *bla*_{KPC} generalmente está asociado al transposón Tn4401 (Shen et al., 2009). Existen 11 variantes alélicas descritas (Yoon et al., 2020).

El mecanismo hidrolítico de estas enzimas requiere en su sitio activo una serina en la posición 70 (Nordmann et al., 2012). Las carbapenemasas KPC tienen la capacidad de hidrolizar una amplia variedad de β -lactámicos incluyendo carbapenemes, así como penicilinas, cefalosporinas y aztreonam. A su vez no son inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam, los que también son hidrolizados por este grupo de enzimas (Patel & Bonomo, 2013).

1.4.2.2 Metallo- β -lactamasas

Las metallo- β -lactamasas (MBL) son las carbapenemasas con más diversidad a nivel molecular y con más impacto en la clínica. Pertenecen a la clase B de la clasificación de Ambler (1980) y a los grupos 3a y 3b del esquema actualizado de Bush, Jacoby y Medeiros (Bush & Jacoby, 2010).

Existen al menos 9 tipos de MBL transmisibles (Cornaglia et al., 2011), aunque las más comunes se incluyen en las familias VIM (con 25 tipos descritos), IMP y NDM (Hammoudi Halat & Ayoub Moubareck, 2020).

El sitio activo de estas enzimas contiene un ión (o iones) de Zn^{+2} , en lugar de serina como en las enzimas de la clase A, esencial para el ataque nucleofílico del anillo β -lactámico. Las MBL pueden hidrolizar todos los β -lactámicos excepto el aztreonam. Esto es debido principalmente al hecho de que las MBL se unen a los monobactámicos con una afinidad muy baja (Hammoudi Halat & Ayoub Moubareck, 2020). No son inhibidas por el ácido clavulánico ni por el tazobactam, pero sí por agentes quelantes como el ácido etilendiamino tetracético (EDTA) (Codjoe & Donkor, 2017). Al igual que las cepas productoras de KPC, las cepas con MBL también pueden producir otras β -lactamasas. Por ello, aunque las MBL no son capaces de hidrolizar el aztreonam, a menudo se identifican BLEE asociadas que si son capaces de hidrolizarlo (Bush, 2010).

1.4.2.3 Carbapenemasas OXA

Pertenecen a la clase D de la clasificación de Ambler (1980) y al grupo 2df del esquema actualizado de Bush, Jacoby y Medeiros (Bush & Jacoby, 2010). Se pueden dividir en varios grupos según la homología de la secuencia: OXA-23, OXA-24, OXA-48 (que incluye OXA-48, OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232), OXA-58, OXA-72 y OXA-143 (Hammoudi Halat & Ayoub Moubareck, 2020). Los genes de las enzimas OXA pueden estar codificados en el cromosoma o en plásmidos (Patel & Bonomo, 2013).

La gran mayoría de las OXA que exhiben actividad carbapenemasas se encuentran en especies de *Acinetobacter* spp., aunque está incrementando el número de las mismas en enterobacterias, en particular en *K. pneumoniae* (Poirel et al., 2012). La expansión de *Acinetobacter* spp. con carbapenemasa parece ser debida a varios clones, mientras que la de las enterobacterias es debida a la transmisión de plásmidos entre las cepas (Patel & Bonomo, 2013).

El nivel de actividad hidrolítica exhibida por las carbapenemasas OXA es bastante débil comparada con la de las MBL; las cepas que producen estas enzimas pueden requerir mecanismos adicionales de resistencia para que la concentración inhibitoria mínima (CIM) de imipenem y meropenem estén por encima de los puntos de corte. Esto, junto al hecho que a menudo son susceptibles a las cefalosporinas de espectro extendido y a los monobactámicos, hace que las cepas productoras de estas enzimas sean difíciles de identificar cuando se utilizan los sistemas automatizados (Woodford et al., 2010).

La β -lactamasa OXA-48 (aislada en *Enterobacterales*, principalmente en *K. pneumoniae*) tiene una mayor actividad carbapenemasa que el resto de las OXA, con las cuales comparte menos de un 50% de homología en su secuencia de aminoácidos (Poirel et al., 2004). Su eficacia para hidrolizar el imipenem es 10 veces mayor que las enzimas OXA de los *Acinetobacter* spp. (Patel & Bonomo, 2013). La enzima OXA-48 también hidroliza las penicilinas y las primeras cefalosporinas, pero su actividad contra las oximiino-cefalosporinas es débil (Poirel et al., 2004).

1.5 Epidemiología de β -lactamasas

La gran mayoría de aislamientos de *Enterobacterales* productores de BLEE han sido aislados con mayor frecuencia en muestras procedentes de pacientes hospitalizados, aunque también pueden encontrarse en muestras de origen comunitario. Estos aislamientos pueden aparecer de forma esporádica, sin relación epidemiológica y afectan a pocos pacientes en un periodo corto de tiempo; pero, también es frecuente la descripción de brotes nosocomiales más extensos.

La presencia de genes que codifican las BLEE en plásmidos facilita su transferencia mediante conjugación entre diversas especies bacterianas. Así, podemos detectar brotes debidos a la diseminación de un plásmido exitoso (diferentes especies de enterobacterias con un plásmido común), o bien a la diseminación de una cepa resistente exitosa (expansión clonal). Además, estos plásmidos pueden llevar asociada resistencia a otros grupos de antimicrobianos (aminoglucósidos, tetraciclinas, quinolonas, etc.) por lo que frecuentemente nos encontramos con microorganismos

multirresistentes. Todo ello determina que las opciones terapéuticas para las infecciones causadas por bacterias que producen BLEE sean muy limitadas.

El tubo digestivo actúa como reservorio de estos microorganismos multirresistentes, además es el nicho ecológico adecuado para que la resistencia se transmita a otras especies bacterianas.

El principal microorganismo causante de brotes nosocomiales de BLEE es *K. pneumoniae*. Este hecho está relacionado con que esta especie forma parte de la microbiota normal del ser humano y animales, sobrevive durante bastante tiempo sobre la piel y fómites, y acepta con cierta facilidad un amplio rango de plásmidos conjugativos. Las primeras epidemias de infección hospitalaria por *K. pneumoniae* portadores de BLEE fueron descritas en Francia a finales de los ochenta (Legrand et al., 1989). Desde entonces se han documentado por todo el mundo numerosos brotes nosocomiales causados por *Enterobacterales* productoras de BLEE (Chapuis et al., 2016; Guzmán-Blanco et al., 2014; Manzur et al., 2007; Rettedal et al., 2012; Stapleton et al., 2016; Uemura et al., 2017). Es un hecho reconocido que el incremento de estos brotes epidémicos está relacionado con un alto consumo de antibióticos, especialmente de CTG. El consumo elevado de estos β -lactámicos favoreció la aparición de estos clones exitosos de *K. pneumoniae* productores de BLEE, que se diseminan con particular facilidad en centros o unidades con factores predisponentes para la transmisión cruzada entre pacientes sometidos a múltiples procedimientos clínicos (Paterson & Yu, 1999).

Los brotes nosocomiales causados por *E. coli* y otros *Enterobacterales* portadores de BLEE han sido, sin embargo, menos frecuentes (Paterson, Singh, et al., 2001) y por lo general se relacionan con infecciones que son de carácter endémico o esporádicas, y que pueden ser tanto nosocomiales como de aparente adquisición en la comunidad.

En Argentina, en la mayoría de los aislamientos de *Enterobacterales* que presentan resistencia a CTG, el mecanismo responsable mayoritario son las enzimas tipo CTX-M (Sennati et al., 2012). Este escenario epidemiológico se observa desde los primeros aislamientos productores de BLEE en nuestro país (Bauernfeind et al., 1992; Melano et al., 2003; Quinteros et al., 2003) hasta la actualidad, en donde CTX-M-15 es la BLEE de mayor prevalencia, seguida por CTX-M-2. En cuanto a las especies portadoras de BLEE encontramos que *K. pneumoniae* es la enterobacteria más importante, con una prevalencia aproximada en nuestro país del 25 al 50 %, seguido por *E. coli* con un porcentaje de aislamientos productores de BLEE del 12 al 26 % (Quinteros et al., 2003; Sennati et al., 2012). El resto se distribuye entre especies de

los géneros *Citrobacter*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Salmonella* y también en *K. oxytoca*.

Bacterias productoras de AmpC plasmídicas han sido descritas en aislamientos nosocomiales y comunitarios en todo el mundo, donde la diseminación de este mecanismo es principalmente debida a la transferencia de elementos móviles entre diferentes especies de bacterias gram negativas (Pires et al., 2015). Las β -lactamasas tipo AmpC plasmídicas han sido encontradas más frecuentemente en *K. pneumoniae*, como así también *K. oxytoca*, *Salmonella* y *P. mirabilis*. A su vez, se identificaron en *E. coli*, aunque esta especie también puede aumentar la producción de su AmpC cromosómica la cual normalmente muestra una muy débil expresión. El aumento en la producción de AmpC cromosómica puede darse por duplicación del gen codificante, mutaciones en el promotor o en el atenuador de la expresión, lo que incrementa la cantidad de enzima (Philippon et al., 2002). Una característica sorprendente es la distribución global de aislamientos productores de enzimas AmpC codificadas en plásmido. En Grecia, la enzima CMY-2 plasmídica fue encontrada simultáneamente en aislamientos de *Enterobacter aerogenes* (actualmente *Klebsiella aerogenes*), *K. pneumoniae* y *E. coli* (Gazouli et al., 1996), y en Francia la enzima ACC-1 se encontró en *E. coli* y *P. mirabilis* aisladas de muestras urinarias (Girlich, Karim, et al., 2000). En los Estados Unidos fueron detectadas en 8 estados diferentes aislamientos de *Salmonella* resistentes a ceftriaxona donde este fenotipo era debido a la β -lactamasa CMY-2 (Dunne et al., 2000). Se han detectado en África (Argelia y Túnez), Asia (India, Japón, Pakistán y Corea del Sur), Europa (Francia, Alemania, Grecia, Italia, Suecia y Reino Unido), Oriente Medio (Arabia Saudita), América del Norte (Estados Unidos) y América del Sur y Central (Argentina y Guatemala) (Philippon et al., 2002). En América del Sur se describieron las enzimas CMY-2, DHA-1, ACT-1 y MIR-1 en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* (Cejas et al., 2012; Egervarn et al., 2014; Jones et al., 2009; Pavez et al., 2008). En la actualidad hay más de 100 enzimas AmpC plasmídicas (<http://bldb.eu/Enzymes.php>, último acceso octubre de 2021) que circulan entre diferentes especies de *Enterobacterales* (Tamma et al., 2019).

Por su parte, las carbapenemasas con mayor prevalencia a nivel mundial en enterobacterias son las KPC las cuales están mayoritariamente asociadas a *K. pneumoniae* y han sido responsables de numerosos brotes en muchos países de Asia, América del Norte, América Latina y Europa, como así también en África (Hammoudi Halat & Ayoub Moubareck, 2020). Si bien KPC se encuentra mayormente asociada a *K. pneumoniae*, también ha sido detectada entre otros miembros del orden *Enterobacterales* y en *P. aeruginosa*, *P. putida* y (Bennett et al., 2009; Robledo et al.,

2011). La mayoría de los aislamientos son obtenidos de muestras de sangre, heridas, orina y esputos, y los pacientes con antecedentes de internación o exposición frecuente a centros sanitarios pueden desarrollar infecciones extrahospitalarias (Codjoe & Donkor, 2017). En América Latina los aislamientos de *K. pneumoniae* portadores de KPC son de carácter endémico (Codjoe & Donkor, 2017) y a su vez el gen *bla_{KPC}* ha sido reportado en aislamientos de *P. aeruginosa* (Villegas et al., 2007). Desde el año 2010 hasta 2017, el incremento en la prevalencia de aislamientos portadores de KPC aumentó considerablemente, principalmente en Argentina y Brasil (Codjoe & Donkor, 2017).

Históricamente, las MBL se encontraron en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. pero actualmente se encuentran diseminadas entre diferentes *Enterobacterales*. Desde su descubrimiento, las MBL se detectaron en todo el mundo (Codjoe & Donkor, 2017; Ktari et al., 2006; Marcano et al., 2008; Nordmann et al., 2011; Queenan & Bush, 2007; Yong et al., 2006; Yong et al., 2009). Además, han sido descritos aislamientos resistentes a colistina y tigeciclina, siendo consideradas cepas pan-resistentes (Codjoe & Donkor, 2017).

La enzima OXA-48 ha sido aislada en países de Europa del este y el norte de África (Codjoe & Donkor, 2017). Aunque el reciente aislamiento de *K. pneumoniae* productor de OXA-48 en India, Senegal y Argentina sugiere una expansión global (Castanheira et al., 2011; Moquet et al., 2011; Poirel et al., 2011).

En resumen, KPC es la carbapenemasa de mayor distribución mundial, siendo endémica en China y América del Sur. Por su parte, las MBL presentan distribución global. Las oxacilinasas del grupo OXA-48 también muestran una elevada distribución mundial, pero es endémica en Turquía principalmente (Hammoudi Halat & Ayoub Moubareck, 2020).

1.6 Factores clínicos asociados a la presencia de β -lactamasas

Las formas clínicas de las infecciones por *Enterobacterales* productores de BLEE varían según el contexto epidemiológico. Las infecciones de carácter endémico y las surgidas fuera del entorno de las unidades de cuidados intensivos se localizan principalmente en el tracto urinario (Lucet et al., 1996; Peña et al., 1998). Por otro lado, en ciertos brotes epidémicos se pudo observar que en las unidades de cuidados intensivos predominan las bacteriemias originadas en el catéter vascular y las infecciones del tracto respiratorio, mientras que en internación y pacientes ambulatorios son prevalentes las infecciones del tracto urinario y las infecciones de localización quirúrgica (Peña et al., 1998). Globalmente, un 40-60% de los pacientes

afectados en unidades de cuidados intensivos son portadores de enterobacterias BLEE positivas en el tracto gastrointestinal (Doi et al., 2017). Entre los pacientes que en sus muestras clínicas desarrollan estas bacterias, más del 60% cursan enfermedad infecciosa y puede detectarse previamente el estado de portador rectal. La mortalidad de este grupo de pacientes suele ser elevada (Lucet et al., 1996; Peña et al., 1998).

Las bacterias portadoras de AmpC cromosómicas poseen el potencial de incrementar la producción de la enzima intratratamiento, ya sea mediante desrepresión o la inducción de la expresión, lo que posibilita la aparición de aislamientos resistentes al aplicar una terapia antibiótica inadecuada. Este comportamiento ha sido observado en *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *S. marcescens* y *M. morgani*. Una característica relevante es que, cuando una cepa hiperproductora es seleccionada por el tratamiento, esta expresión aumentada de AmpC es irreversible, incrementando las tasas de resistencia (Jacoby, 2009). Este escenario posibilita un aumento en la mortalidad o genera estadías hospitalarias más prolongadas y mayores gastos asociados al tratamiento y la internación (Cosgrove et al., 2002).

En el caso de las enzimas AmpC mediadas por plásmidos, se han encontrado en aislamientos de pacientes los cuales presentaron varios días de hospitalización, pero también han sido reportados aislamientos en centros de rehabilitación y clínicas de atención ambulatoria (Hanson et al., 2008; Migliavacca et al., 2007). Los factores de riesgo asociados a infecciones sanguíneas causadas por cepas de *K. pneumoniae* productoras de AmpC incluyen hospitalización prolongada, atención en unidades de cuidados intensivos, necesidad de cateterismo venoso central, catéter urinario permanente y administración previa de antibióticos, especialmente cefalosporinas de amplio espectro y combinaciones con inhibidores de β -lactamasas. Estos factores son muy similares a los que puede producir una infección por *K. pneumoniae* productora de BLEE (Pai et al., 2004; Papagiannitsis et al., 2007). También pueden afectar a pacientes con leucemia y cáncer o aquellos que recibieron algún tipo de trasplante. Las principales muestras donde se aíslan bacterias portadoras de AmpC plasmídicas son la orina, la sangre, heridas de la piel, esputo y heces (Jacoby, 2009). A su vez, las cepas con enzimas AmpC mediadas por plásmidos también pueden co-expresar una BLEE, lo que dificulta su detección. Sin dudas, los *Enterobacterales* productores de AmpC plasmídicas pueden causar grandes brotes con morbi-mortalidad significativa, lo que enfatiza la importancia de la vigilancia basada en las técnicas de detección de laboratorio y las medidas de control de infecciones (Meini et al., 2019).

La elevada prevalencia de aislamientos de *Enterobacterales* productores de BLEE y AmpC observada a partir de la década del 90 contribuyó al aumento del

consumo y utilización de carbapenemes (Patel & Bonomo, 2013). De esta manera, estos antibióticos se convirtieron en herramientas vitales en el tratamiento de infecciones graves adquiridas en la comunidad y nosocomiales. La gran dependencia en el uso de estos agentes ha posibilitado la aparición de múltiples aislamientos resistentes a carbapenemes (y la subsecuente diseminación de cepas productoras de carbapenemasas), generando en la actualidad enormes inconvenientes a nivel mundial a la hora de seleccionar terapias antibióticas efectivas.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

- Determinar la prevalencia de resistencia a CTG en aislamientos de *Enterobacterales* aislados en Santa Fe.
- Identificar los mecanismos involucrados en la resistencia a CTG en los aislamientos de *Enterobacterales* estudiados.
- Determinar la prevalencia de resistencia a carbapenemes en aislamientos de *Enterobacterales* aislados en Santa Fe.
- Identificar los mecanismos involucrados en la resistencia a carbapenemes en los aislamientos de *Enterobacterales* estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Aislamientos bacterianos

1.1.1 Colección de microorganismos

Se llevó a cabo un estudio prospectivo donde se registraron todos los aislamientos de enterobacterias clínicamente significativos provenientes de pacientes ambulatorios e internados que asistieron a 4 instituciones de salud de la ciudad de Santa Fe durante dos meses no consecutivos (diciembre 2012 y abril 2013). Las instituciones de salud fueron: el Hospital “José M. Cullen”, el Hospital de Niños “Dr. Orlando Alassia”, el Hospital “J.B. Iturraspe” y la Interlab (Red de laboratorios ambulatorios de la ciudad de Santa Fe). En este estudio se incluyeron los aislamientos que mostraron resistencia a al menos una CTG.

Por otro lado, existe el Laboratorio Central de la Provincia de Santa Fe (LCPSF) que forma parte de la Red de Laboratorios de Diarreas y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria, donde se remite *S. enterica* para estudios epidemiológicos. En este trabajo se realizó un estudio retrospectivo que incluyó a todos los aislamientos de *S. enterica* de origen humano que fueron identificados durante el año 2014 considerando la información de la fecha y el tipo muestra de donde fueron recuperados.

1.1.2 Identificación bacteriana

Los aislamientos fueron identificados tanto por pruebas bioquímicas manuales, como así también, por métodos automatizados mediante Vitek (bioMérieux, Francia) o Phoenix (Becton Dickinson, Estados Unidos) dependiendo del equipamiento disponible en cada institución de salud. Una vez recibidos los aislamientos se realizó la verificación de identidad mediante pruebas bioquímicas mínimas.

La serotipificación de los aislamientos de *Salmonella* se realizó de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White (Popoff et al., 1996) utilizando sueros somáticos y flagelares provistos por el Instituto de Producción de Biológicos del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

1.1.3 Determinación de relación clonal entre los aislamientos de *Salmonella*

Los aislamientos de *S. enterica* con sospecha de brote intrahospitalario y similitud en el perfil de sensibilidad, se remitieron al Servicio Enterobacterias INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, donde se realizó el estudio de subtipificación molecular

utilizando el protocolo estandarizado de electroforesis de campo pulsado (PFGE) para *Salmonella* de la Red *PulseNet* Internacional con la enzima *XbaI* (Goering, 2010).

1.1.4 Conservación de los microorganismos

Los aislamientos fueron conservados en caldo tripteína soya (CTS) (Britania, Argentina) con glicerol (Cicarelli, Argentina) al 15 %, y mantenidos a temperatura de -20 °C (conservados de uso frecuente) y -80 °C (conservados de reserva) hasta el momento de su uso. Su recuperación se realizó en agar tripteína soya (ATS) (Britania, Argentina) con antibiótico para evitar la pérdida de los plásmidos mediante presión selectiva. Los antibióticos adicionados a estos medios de cultivo fueron ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL o ceftriaxona a una concentración final de 1 µg/mL.

1.2 Perfiles de sensibilidad a antibióticos

Los perfiles de sensibilidad de los aislamientos estudiados fueron obtenidos mediante equipos automatizados Vitek (bioMérieux, Francia) o Phoenix (Becton Dickinson, Estados Unidos), ensayos cualitativos por el método de difusión en agar con discos (antibiograma) y la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en medio sólido. Los antibiogramas y las CIM fueron realizados siguiendo las recomendaciones y lineamientos del CLSI (2020) y utilizando agar Mueller Hinton (Britania, Argentina).

Los antibióticos ensayados en los aislamientos de *Enterobacterales* estudiados fueron ampicilina (AMP), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefoxitina (FOX), cefepime (FEP), imipenem (IMI), meropenem (MEM), ertapenem (ETP), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), trimetoprima/sulfametoxazol (TMS) y nitrofurantoína (NIT).

En los aislamientos de *S. enterica* se ensayaron AMP, ampicilina/sulbactam (AMS), cefazolina (CFZ), FOX, CTX, CAZ, FEP, ácido nalidíxico (NAL), CIP, TMS, tetraciclina (TET), GEN y amikacina (AMK) y cloranfenicol (CMP). De acuerdo a los perfiles de sensibilidad observados, se definieron a los aislamientos como multirresistentes cuando presentaron resistencia a 3 o más grupos de antimicrobianos según el criterio del Consenso Latinoamericano para categorizar y notificar patógenos multiresistentes (Jiménez Pearson et al., 2019).

1.3 Detección fenotípica de β-lactamasas

El fenotipo de resistencia a β-lactámicos (β-lactamasas) se evaluó mediante la técnica de difusión en agar usando la disposición estratégica de discos propuesta por

la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica (SADEBAC) de la Asociación Argentina de Microbiología (AAM) (Famiglietti et al., 2005) con modificaciones (Etapa 1). La disposición de los discos de muestra en la Figura 9.

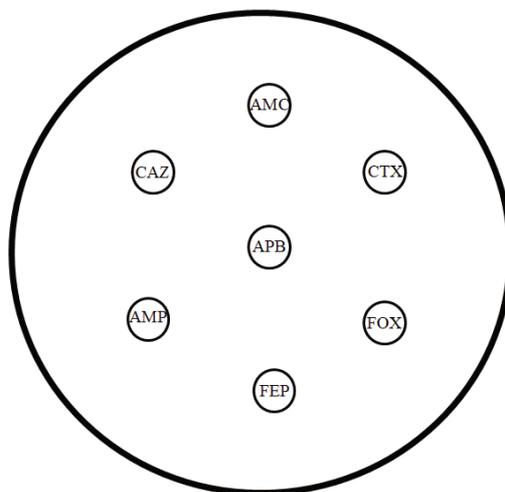


Figura 9: Esquema de la distribución de discos utilizada. Distancia de 25 mm de centro a centro entre los discos: CAZ-amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), CTX-AMC, CTX-ácido fenilborónico (APB) y CAZ-APB.

A partir de los resultados obtenidos en la etapa 1 se continúa con la etapa confirmatoria, que permite determinar qué tipo de β -lactamasa produce el aislamiento.

1.3.1 Detección de BLEE

La sospecha de BLEE a partir del análisis de los resultados de la etapa 1 se caracteriza por la resistencia a alguna de las CTG ensayadas (CTX o CAZ), resistencia o sensibilidad disminuida a FEP y la sinergia (efecto “huevo”) entre ácido clavulánico (CLV), presente en el disco de AMC y las CTG. Todos los aislamientos sospechados de portar BLEE fueron sometidos a la prueba confirmatoria propuesta por el CLSI (2020). Este ensayo consiste en la realización de un antibiograma con discos de CTX, CAZ, CTX/CLV y CAZ/CLV. Se confirmó el aislamiento como portador de BLEE cuando la diferencia entre los halos de inhibición de los discos con y sin CLV mostraron una diferencia ≥ 5 mm. Se evaluó la sinergia entre FEP y CLV, en aquellos aislamientos donde el fenotipo de BLEE puede ser enmascarado por la presencia de enzimas tipo AmpC desreprimidas.

1.3.2 Detección de AmpC

La resistencia a alguna de las CTG ensayadas (CTX o CAZ) con sensibilidad a FEP, resistencia a FOX son indicadores de la presencia de β -lactamasas tipo AmpC.

Para verificar y confirmar la presencia de este mecanismo se realiza la prueba de sinergia entre CTG y APB donde se reduce la distancia entre discos a 20 o 15 mm dependiendo del diámetro de los halos observados en la etapa 1.

1.3.3 Detección de carbapenemasas

Se consideró a cada aislamiento como sospecho de expresar carbapenemasas cuando mostró resistencia a todos los β -lactámicos ensayados en la etapa 1. Para confirmar la expresión de β -lactamasas activas frente a carbapenemes se realizaron antibiogramas utilizando IMI, MEM y ETP dispuestos de forma estratégica junto a discos con inhibidores, APB para detectar KPC y EDTA para detectar MBL. El esquema y distribución de discos se muestra en la figura 10.

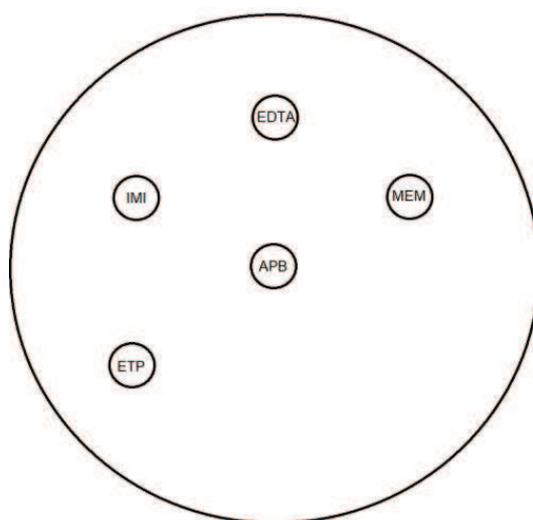


Figura 10: Esquema de la distribución de discos utilizada para la detección de carbapenemasas. Distancia en 25 mm medida de centro a centro entre los discos de IMI-EDTA, MEM-EDTA, IMI-APB, MEM-APB y ETP-APB.

La resistencia a carbapenemes y la sinergia con APB (efecto “huevo”) indica la presencia de serino-carbapenemasas tipo KPC, mientras que la resistencia a carbapenemes y sinergia con EDTA sugiere la presencia de MBL.

1.4 Detección y caracterización molecular de β -lactamasas

La caracterización molecular de los marcadores de resistencia a β -lactámicos responsables de producir los fenotipos observados previamente se realizó mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando oligonucleótidos específicos para cada grupo de β -lactamasas. Se utilizó como molde el ADN total obtenido mediante lisis celular por calentamiento.

1.4.1 Obtención de ADN total mediante lisis celular por calentamiento

A partir de colonias aisladas de los cultivos bacterianos en estudio, se preparó una suspensión en 200 µL de agua *milliQ* estéril contenidos en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. La suspensión alcanzada tuvo una turbidez semejante al 1 de la escala de McFarland. Se colocó el tubo con la suspensión en un baño de agua a 100 °C durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo, los restos celulares se descartaron por centrifugación a 7000 rpm en una microcentrífuga durante 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo que se utilizó para la realización de reacciones de PCR en el momento o se congeló a -20 °C hasta su uso dentro de los próximos 3 o 4 días.

1.4.2 Detección molecular de BLEE

Se utilizaron PCR simples para la detección de los genes codificantes de las enzimas CTX-M grupo 1, CTX-M grupo 2, CTX-M grupo 9, CTX-M grupo 8/25, PER-2 y SHV. En la tabla 4 se resumen los cebadores (Invitrogen, Argentina) utilizados para la amplificación de cada gen, junto a su temperatura de anillado y el tamaño del producto de amplificación a obtener.

Tabla 4: Cebadores empleados para la detección de las diferentes BLEE.

Gen blanco	NC	Cebador (5'→3')	TA (°C)	TP (pb)
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 1}	CTX-M-1-CF	ATGGTAAAAAATCACTGC	50	864
	CTX-M-1-CR	GGTGACGATTTTAGCCGC		
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 2}	BLA 1	TTAATGATGACTCAGAGCATTC	50	902
	BLA 2	GATACCTCGCTCCATTTATTG		
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 9}	CTX-M-9CF	ATGGTGACAAAGAGAGTG	60	873
	CTX-M-9CR	TCACAGCCCTTCGGCGATG		
<i>bla</i> _{CTX-M grupo 8/25}	CTX-M-8-25 F	ATGAGAMAWMGCWTWARGC	45	878
	CTX-M-8 R	TAGAATTAATAACCGTCGGTGAC		
<i>bla</i> _{PER-2}	PER A	TGTGTTTTACCGCTTCTGCTCTG	50	880
	PER B	CAGCTCAAAGTATAAGCCGCTTG		
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F	TCGGGCCGCGTAGGCATGAT	54	625
	SHV-R	AGCAGGGCGACAATCCCGCG		

NC: Nombre del Cebador

TA: Temperatura de Anillado

TP: Tamaño del Producto de amplificación

Referencias de oligonucleótidos degenerados: **W**: A o T; **M**: A o C; **R**: A o G

Para cada una de las reacciones de PCR se usaron los reactivos deoxinucleósidos trifosfato (dNTP), *taq* polimerasa, *buffer* de reacción y cloruro de

magnesio (Inbio Highway, Argentina) y condiciones específicas. A continuación se detallan cada una de ellas:

- PCR para genes *bla*_{CTX-M grupo 1}

Mezcla de reacción (1x) para un volumen final de 25 µL.

Reactivo (concentración)	Cantidad (µL)
Buffer de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
dNTPs (10 mM)	1
CTX-M-1-CF (10 µM)	1,5
CTX-M-1-CR (10 µM)	1,5
Taq polimerasa (5 U/µL)	0,2
H ₂ O milliQ estéril	14,8
ADN molde	2

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 segundos, anillado a 50 °C durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 minutos.

Se utilizó como control positivo de reacción *K. pneumoniae* B4 (cedida por el Cepario de la FFyB-UBA) y como control negativo *E. coli* TOP10.

- PCR para genes *bla*_{CTX-M grupo 2}

Mezcla de reacción (1x) para un volumen final de 25 µL.

Reactivo (concentración)	Cantidad (µL)
Buffer de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (10 mM)	1
Bla 1 (10 µM)	2,5
Bla 2 (10 µM)	2,5
Taq polimerasa (5U/µL)	0,2
H ₂ O milliQ estéril	12,3
ADN molde	2

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, anillado a 50 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Se utilizó como control positivo de reacción *S. enterica* S21 (Di Conza et al., 2002) y como control negativo *E. coli* TOP10.

- PCR para genes *bla*_{CTX-M grupo 9}.

Mezcla de reacción (1x) para un volumen final de 25 µL.

Reactivo (concentración)	Cantidad (µL)
Buffer de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (10 mM)	1
CTX-M-9CF (10 µM)	2,5
CTX-M-9CR (10 µM)	2,5
Taq polimerasa (5U/µL)	0,2
H ₂ O milliQ estéril	12,3
ADN molde	2

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, anillado a 60 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Se utilizó como control positivo de reacción *E. coli* SM7 (cedida por el Cepario de la FFyB-UBA) y como control negativo *E. coli* TOP10.

- PCR para genes *bla*_{CTX-M grupo 8/25}

Mezcla de reacción (1x) para un volumen final de 25 µL.

Reactivo (concentración)	Cantidad (µL)
Buffer de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (10 mM)	1
CTX-M-8-25 F (10 µM)	2,5
CTX-M-8 R (10 µM)	2,5
Taq polimerasa (5U/µL)	0,2
H ₂ O milliQ estéril	12,3
ADN molde	2

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, anillado a 45 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Se utilizó como control positivo de reacción *K. pneumoniae* CL5 (cedida por el Cepario de la FFyB-UBA) y como control negativo *E. coli* TOP10.

- PCR para genes *bla_{PER-2}*

Mezcla de reacción (1x) para un volumen final de 25 µL.

Reactivo (concentración)	Cantidad (µL)
Buffer de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (10 mM)	1
PER A (10 µM)	1,5
PER B (10 µM)	1,5
Taq polimerasa (5U/µL)	0,3
H ₂ O <i>milliQ</i> estéril	14,2
ADN molde	2

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, anillado a 50 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Se utilizó como control positivo de reacción *E. cloacae* CX1 (cedida por el Cepario de la FFyB-UBA) y como control negativo *E. coli* TOP10.

- PCR para genes *bla_{SHV}*

Mezcla de reacción (1x) para un volumen final de 25 µL.

Reactivo (concentración)	Cantidad (µL)
Buffer de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (10 mM)	1
SHV-F (10 µM)	2,5
SHV-R (10 µM)	2,5
Taq polimerasa (5U/µL)	0,2
H ₂ O <i>milliQ</i> estéril	12,3
ADN molde	2

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, anillado a 54 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Se utilizó como control positivo de reacción *K. pneumoniae* B4 (cedida por el Cepario de la FFyB-UBA) y como control negativo *E. coli* TOP10.

1.4.3 Detección molecular de AmpC

Para la detección de β -lactamasas tipo AmpC, se utilizó la PCR multiplex desarrollada por Perez-Perez y Hanson (2002), que consta de 2 reacciones e implica 6 pares de cebadores específicos (Tabla 5) que detectan la mayoría de los genes codificantes de AmpC plasmídicas, determinando la presencia de los alelos ACC, CIT, DHA, EBC, FOX y MOX. Para amplificar el gen completo de bla_{CMY} , se realizó PCR simple, empleando cebadores específicos denominados CMY-CF y CMY-CR.

Tabla 5: Cebadores empleados para la detección de las diferentes β -lactamasa tipo AmpC plasmídicas.

Gen blanco	NC	Cebador (5'→3')	TA (°C)	TP (pb)
bla_{MOX}	MOXM F	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	64	520
	MOXM R	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		
bla_{CIT}	CITM F	TGGCCAGAAGTACAGGCAAA	64	462
	CITM R	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
bla_{DHA}	DHAM F	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	64	405
	DHAM R	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
bla_{ACC}	ACCM F	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	64	346
	ACCM R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC		
bla_{EBC}	EBCM F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	64	302
	EBCM R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		
bla_{FOX}	FOXM F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	64	190
	FOXM R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		
bla_{CMY-2}	CMY-CF	ATGATGAAAAAATCGTTATGCT	50	1146
	CMY-CR	TTATTGCAGCTTTTCAAGAATGCG		

NC: Nombre del Cebador

TA: Temperatura de Anillado

TP: Tamaño del Producto de amplificación

A continuación se detallan las mezclas de reacción para los dos reacciones multiplex y las condiciones de ciclado utilizadas.

- PCR multiplex para la detección de AmpC.

Primera mezcla de reacción (1x) para un volumen final de 25 μ L.

Reactivo (concentración)	Cantidad (μ L)
Buffer de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
dNTPs (10 mM)	0,5
MOXM F (10 μ M)	1,5
MOXM R (10 μ M)	1,5
CITM F (10 μ M)	1,5
CITM R (10 μ M)	1,5
DHAM F (10 μ M)	1,5
DHAM R (10 μ M)	1,5
Taq polimerasa (5U/ μ L)	0,2
H ₂ O <i>milliQ</i> estéril	9,3
ADN molde	2

Segunda mezcla de reacción (1x) para un volumen final de 25 μ L.

Reactivo (concentración)	Cantidad (μ L)
Buffer de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
dNTPs (10 mM)	0,5
ACCM F (10 μ M)	1,5
ACCM R (10 μ M)	1,5
EBCM F (10 μ M)	1,5
EBCM R (10 μ M)	1,5
FOXM F (10 μ M)	1,5
FOXM R (10 μ M)	1,5
Taq polimerasa (5U/ μ L)	0,2
H ₂ O milliQ estéril	9,3
ADN molde	2

Las condiciones de ciclado utilizadas para ambas mezclas de reacción fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillado a 63 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

Se utilizaron como controles positivos de reacción *E. coli* URO8 (CIT), aislada y caracterizada previamente por el grupo de trabajo (Marchisio et al., 2015), *M. morgani* MM16 (DHA), *H. alvei* (ACC) y *E. cloacae* CX1 (EBC) y como control negativo *E. coli* TOP10.

- PCR simple para amplificación del gen completo *bla*_{CMY}.

Mezcla de reacción (1x) para un volumen final de 25 μ L.

Reactivo (concentración)	Cantidad (μ L)
Buffer de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
dNTPs (10 mM)	1
CMY-CF (10 μ M)	1,5
CMY-CR (10 μ M)	1,5
Taq polimerasa (5U/ μ L)	0,2
H ₂ O milliQ estéril	14,8
ADN molde	2

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, anillado a 50 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto y 15 segundos.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Se utilizó como control positivo de reacción *E. coli* URO8 (Marchisio et al., 2015) y como control negativo *E. coli* TOP10.

1.4.4 Detección molecular de carbapenemasas

Se realizó la detección de carbapenemasas mediante PCR simples para los genes *bla_{KPC}* y la familia de *bla_{OXA-48}*. En la familia OXA-48 se incluyen las variantes 163, 181, 204, 232, 244, 245 y 247. En la tabla 6 se especifican los cebadores utilizados.

Tabla 6: Cebadores empleados para detectar las diferentes carbapenemasas.

Gen blanco	NC	Cebador (5'→3')	TA (°C)	TP (pb)
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	55	893
	KPC-R	TTTTTCAGAGCCTTACTGCC		
<i>bla_{OXA-48}</i>	OXA-48A	TTGGTGGCATCGATTATCGG	55	743
	OXA-48B	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC		

NC: Nombre del Cebador

TA: Temperatura de Anillado

TP: Tamaño del Producto de amplificación

A continuación se detallan las mezclas y las condiciones de reacción para la detección de genes codificantes de carbapenemasas.

- PCR para genes *bla_{KPC}*

Mezcla de reacción (1x) con volumen final de 25 µL.

Reactivo (concentración)	Cantidad (µL)
Buffer de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,5
dNTPs (10 mM)	1
KPC-F (10 µM)	2,5
KPC-R (10 µM)	2,5
Taq polimerasa (5U/µL)	0,2
H ₂ O <i>milliQ</i> estéril	11,8
ADN molde	2

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, anillado a 55 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Se utilizó como control positivo de reacción *K. pneumoniae* HI1 (cedida por el Cepario de la FFyB-UBA) y como control negativo *E. coli* TOP10.

- PCR para genes *bla*_{OXA-48}

Mezcla de reacción (1x) con volumen final de 25 µl.

Reactivo (concentración)	Cantidad (µl)
Buffer de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (10 mM)	1
OXA-48A (10 µM)	1,5
OXA-48B (10 µM)	1,5
Taq polimerasa (5U/µl)	0,2
H ₂ O <i>milliQ</i> estéril	14,3
ADN molde	2

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, anillado a 55 °C durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 1 minuto.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

Se utilizó como control positivo de reacción *K. pneumoniae* M37 (cedida por el Cepario de la FFyB-UBA) y como control negativo *E. coli* TOP10.

1.4.5 Electroforesis en geles de agarosa

Los productos amplificados en las reacciones de PCR previamente descritas fueron resueltos a 6V/cm en geles de agarosa (Genbiotech, Argentina) al 1 % y al 2 % en *buffer* TAE 1X (ver en la sección Anexos la composición del *buffer* TAE). Se usó la concentración de agarosa al 1 % para los productos de PCR mayores a 700 pb, y al 2 % para productos de menor tamaño. Como colorante se utilizó GelRed (Biotium, Estados Unidos) según las recomendaciones del fabricante y se emplearon marcadores de peso molecular, tales como Ladder 100 bp y 1 Kb (Inbio Highway, Argentina). Los geles fueron visualizados con el transiluminador UV, *Molecular Imager GelDoc XR Sistem*, Life Science Research, Bio-Rad.

1.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete de software estadístico SPSS para Windows v. 16.0.1. Las frecuencias de resistencia a los antimicrobianos solo se calcularon si se analizaron al menos 15 aislamientos para una combinación de

organismo / antimicrobiano específico. Los resultados se presentaron con el intervalo de confianza del 95% entre paréntesis (IC₉₅).

RESULTADOS

1.1 Estudio prospectivo de *Enterobacterales* con resistencia a CTG

1.1.1 Distribución de especies

Durante los dos periodos evaluados se registraron 675 aislamientos totales de *Enterobacterales* obtenidos en las 4 instituciones de salud incluídas en el relevamiento. Se obtuvieron 305 aislamientos durante diciembre de 2012 y 370 durante abril de 2013. La distribución de especies encontrada fue la siguiente: 463 *E. coli*, 101 *K. pneumoniae*, 8 *K. oxytoca*, 52 *P. mirabilis*, 2 *P. vulgaris*, 14 del complejo *E. cloacae*, 4 *E. aerogenes* (actualmente *K. aerogenes*), 1 *Enterobacter asburiae*, 5 *S. marcescens*, 6 *M. morgani*, 7 *C. freundii*, 4 *C. koseri*, 2 *Providencia rettgeri*, 1 *Providencia stuartii*, 2 *Shigella flexneri*, 2 *Cronobacter sakazakii* (actualmente *Enterobacter sakazakii*) y 1 *Salmonella* sp. En la figura 11 se muestra la distribución de especies expresada en porcentajes sobre los 675 aislamientos.

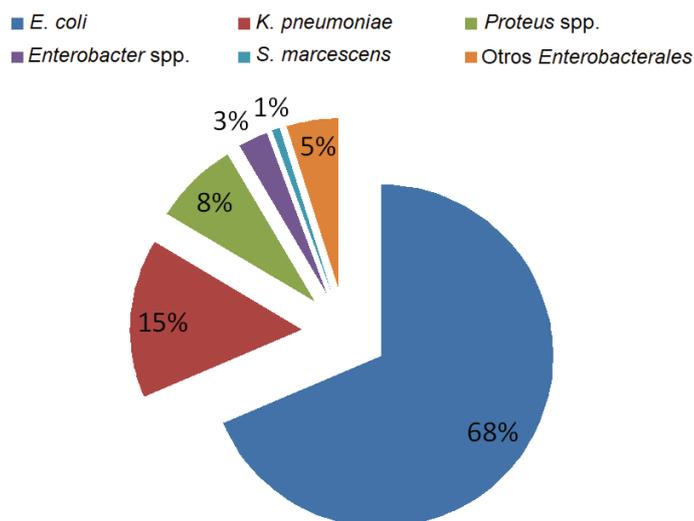


Figura 11: Distribución porcentual de especies encontrada entre los 675 aislamientos de *Enterobacterales* registrados en el estudio.

1.1.2 Prevalencia de *Enterobacterales* resistentes a CTG

De los 675 *Enterobacterales* aislados durante el periodo de estudio, se caracterizaron 60 aislamientos que presentaron resistencia a al menos una CTG, los cuales fueron incluidos en este trabajo. De esta manera, la prevalencia obtenida de *Enterobacterales* resistentes a CTG en la ciudad de Santa Fe fue de 8,89% (IC₉₅ 6,96% – 11,29%). La distribución de especies que presentaron resistencia a CTG fue la siguiente: 31/60 *K. pneumoniae*, 16/60 *E. coli*, 6/60 del complejo *E. cloacae*, 5/60 *P. mirabilis* y 2/60 *S. marcescens*, la cual se representa porcentualmente en la figura 12.

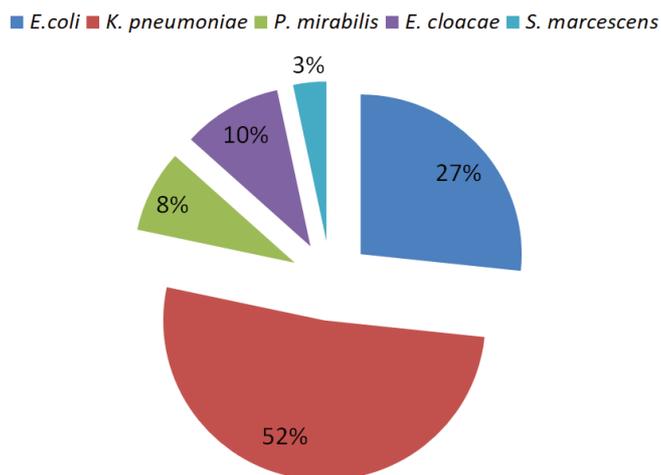


Figura 12: Distribución porcentual de especies entre los aislamientos de *Enterobacteriales* que presentaron resistencia a CTG.

Por otro lado, si se tienen en cuenta los totales registrados para cada especie, se obtuvo que de los 463 aislamientos de *E. coli* solo 16 mostraron resistencia a CTG (3,5%), para *K. pneumoniae* 31/101 (30,7%), para *Proteus* spp. 5/54, para *Enterobacter* spp. 6/19 y para *S. marcescens* 2/5 fueron resistentes a CTG (Figura 13).

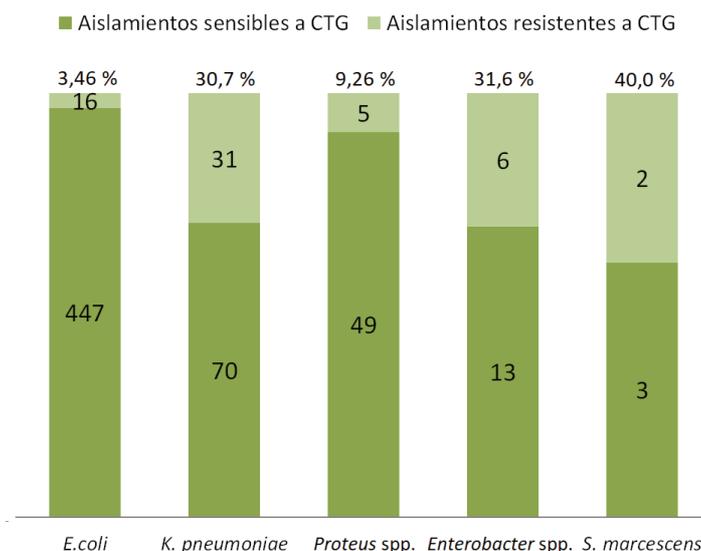


Figura 13: Cantidad de aislamientos sensibles y resistentes a CTG (y porcentajes de resistencia) para las especies recuperadas.

1.1.3 Detección fenotípica de β -lactamasas

1.1.3.1 Detección fenotípica de BLEE

De los 60 aislamientos estudiados se caracterizaron fenotípicamente como portadores de BLEE un total de 50. Se identificaron 13/16 *E. coli*, 28/31 *K. pneumoniae*, 4/5 *P. mirabilis*, 3/6 *E. cloacae* (los 6 aislamientos también mostraron fenotipo de AmpC) y 2/2 *S. marcescens*. Para arribar a estos resultados se evaluaron

mediante la técnica de difusión con discos los perfiles de sensibilidad a AMP, CTX, CAZ, FEP y FOX, como así también la sinergia entre las diferentes cefalosporinas e inhibidores de β -lactamasas (CLV y APB).

De esta manera, para los 16 aislamientos de *E. coli* se observó resistencia en 16/16 a AMP y CTX, 5/16 a CAZ, 12/16 a FEP (también se incluyeron los que mostraron sensibilidad disminuida o sensibilidad dosis dependiente-SSD) y 3/16 a FOX. Los perfiles de sensibilidad observados para AMP, CTX y CAZ se correlacionan con los valores de CIM obtenidos para cada aislamiento. La prueba confirmatoria de BLEE resultó positiva para 13/16 aislamientos. Por otro lado, se destaca que los 3 aislamientos negativos a la prueba confirmatoria de BLEE son los que presentaron resistencia a FOX.

En *K. pneumoniae* se observó resistencia en 31/31 a CTX, 30/31 a CAZ, 31/31 a FEP (también se incluyeron los que mostraron sensibilidad disminuida o SSD) y 4/31 a FOX. Los perfiles de sensibilidad observados para CTX y CAZ se correlacionan con los valores de CIM obtenidos para cada aislamiento. En 3 de los 4 aislamientos resistentes a FOX también se observó resistencia a carbapenemes. La prueba confirmatoria de BLEE resultó positiva para 28 aislamientos.

En *P. mirabilis* se observó resistencia en 5/5 a AMP y CTX, 2/5 a CAZ, 3/5 a FEP y 2/5 a FOX. Los perfiles de sensibilidad observados para AMP, CTX y CAZ se correlacionan con los valores de CIM obtenidos para cada aislamiento. La prueba confirmatoria de BLEE resultó positiva para 4/5 aislamientos.

En el complejo *E. cloacae* se observó resistencia en 6/6 a CTX, CAZ y FOX (se considera con resistencia intrínseca a FOX) y en 3/6 a FEP. La prueba confirmatoria de BLEE resultó positiva para 3/6 aislamientos. La misma fue respaldada con la sinergia entre AMC y FEP.

Para los 2 aislamientos de *S. marcescens* se observó resistencia en 2/2 a CTX, CAZ y FEP, en cambio, ambos aislamientos fueron sensibles a FOX (aunque se consideran con resistencia intrínseca a FOX). La prueba confirmatoria de BLEE resultó positiva para ambos aislamientos.

A modo ilustrativo y como ejemplo de interpretación de la etapa 1 para la detección fenotípica de β -lactamasas, usando el método de difusión en agar con discos de antibiótico; se muestra en la figura 14 el fenotipo obtenido para un aislamiento de *E. coli* portador de BLEE. En esta etapa fue posible determinar el perfil de sensibilidad a los diferentes β -lactámicos y evaluar los efectos sinérgicos entre cefalosporinas e inhibidores.

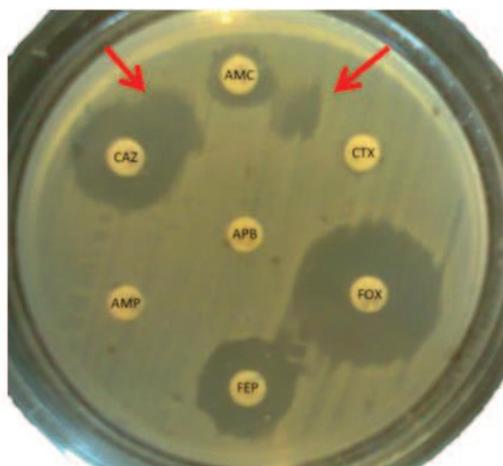


Figura 14: Aislamiento de *E. coli* productor de BLEE. Usando el método de difusión en agar con discos de antibióticos Se observa resistencia a CTX y CAZ (CTG) y efecto sinérgico con el disco de AMC (se indica con flechas rojas). Además, el aislamiento es resistente a FEP y sensible a FOX, con ausencia de sinergia entre cefalosporinas y APB.

La misma interpretación se puede aplicar para otras especies. En la figura 15 se aprecia el comportamiento de un aislamiento de *K. pneumoniae* productor de BLEE.

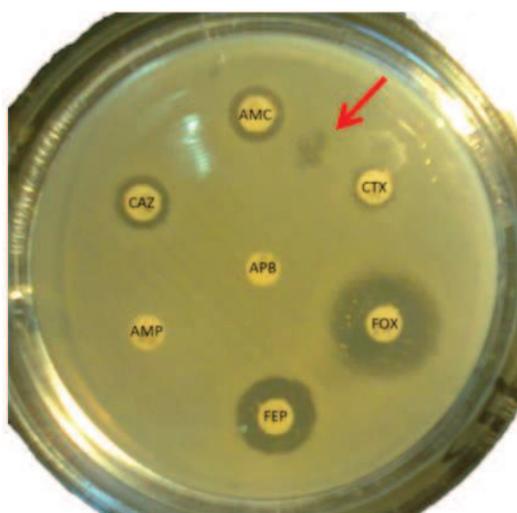


Figura 15: Aislamiento de *K. pneumoniae* productor de BLEE. Usando el método de difusión en agar con discos de antibióticos Se observa resistencia a CTX y CAZ (CTG) y efecto sinérgico entre CTX y el disco de AMC (se indica con una flecha roja). En este caso, no se visualiza la sinergia entre CAZ y AMC. Además, muestra resistencia a FEP y sensibilidad a FOX, con ausencia de sinergia entre cefalosporinas y APB.

De los 50 aislamientos caracterizados como productores de BLEE mediante la prueba confirmatoria propuesta por el CLSI cabe destacar que 13 presentaran resistencia a CTX y sensibilidad a CAZ (perfiles evaluados por difusión con discos y CIM). Este fenómeno se conoce como resistencia disociada a CTG y será abordado con más detalle en el próximo capítulo de este trabajo.

1.1.3.2 Detección fenotípica de AmpC

Para el caso de las β -lactamasas de tipo AmpC fueron detectadas en 3 aislamientos de *E. coli*, en 1 de *P. mirabilis* y el fenotipo característico de estas enzimas se observó en los 6 aislamientos de *E. cloacae*.

Mediante la técnica de difusión por discos se observó en los 3 aislamientos de *E. coli* resistencia a FOX y CTX y sensibilidad a FEP. A su vez, solo 2 aislamientos mostraron resistencia a CAZ. Para respaldar este resultado se verificaron los valores de CIM obtenidos para este aislamiento en particular observándose que los mismos fueron de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambas CTX y CAZ, lo que por puntos de cortes establecidos por el CLSI resulta en un perfil de CTX resistente y CAZ sensible (resistencia disociada a CTG).

Un comportamiento similar se visualizó en el único aislamiento de *P. mirabilis* productor de AmpC, el cual mostró resistencia a FOX, sensibilidad a FEP y resistencia disociada a CTG (CTX^R y CAZ^S) con valores de CIM de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para CTX y CAZ.

Para el caso de *E. cloacae* se detectó la producción de AmpC en los 6 aislamientos, lo que era esperable debido a la presencia cromosómica de este tipo de enzimas en esta especie bacteriana. Estos aislamientos fueron resistentes a ambas CTG.

A modo ilustrativo en la figura 16 se describe la interpretación de la etapa 1 para la detección fenotípica de β -lactamasas tipo AmpC. En este caso, se muestra el fenotipo obtenido para un aislamiento de *E. coli* productor de AmpC.

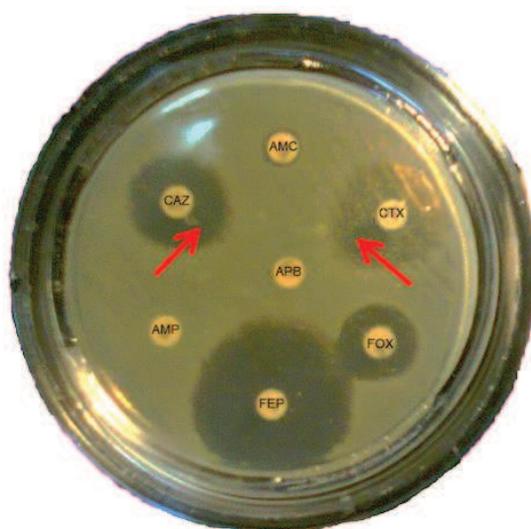


Figura 16: Aislamiento de *E. coli* productor de AmpC. Usando el método de difusión en agar con discos de antibióticos Se observa efecto sinérgico entre CTX y CAZ y el disco de APB (se indica con una flecha roja). Además, muestra resistencia a FOX y sensibilidad a FEP, con ausencia de sinergia entre cefalosporinas y AMC.

1.1.3.3 Detección fenotípica de carbapenemasas

Se observó resistencia a los carbapenemes ensayados en 3 aislamientos de *K. pneumoniae*. En la etapa 1, los 3 aislamientos fueron resistentes a todos los β -lactámicos probados en los ensayos de difusión. De esta manera se procedió a la realización del antibiograma descrito en la figura 10 donde se pudo apreciar resistencia a IMI, MEM y ETP, y sinergia entre estos carbapenemes y APB, fenotipo característico de aislamientos productores de KPC. A modo ilustrativo en la figura 17 se muestra el perfil de sensibilidad a β -lactámicos observado para un aislamiento productor de carbapenemasa. En la figura 18 se puede apreciar el efecto sinérgico entre los carbapenemes y el APB característico de un aislamiento de *K. pneumoniae* productor de KPC.

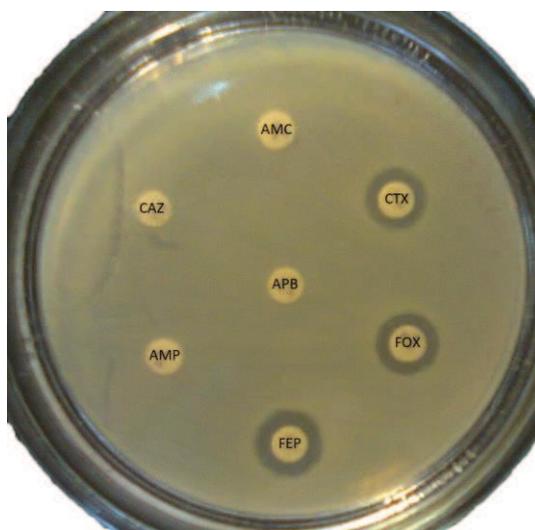


Figura 17: Aislamiento de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa. Se observa resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos ensayados.

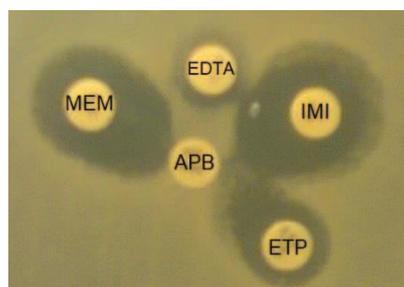


Figura 18: Efecto sinérgico entre carbapenemes y APB. Se visualiza el efecto "huevo" producido por la sinergia generada entre IMI, MEM y ETP con el APB.

1.1.4 Caracterización genotípica de β -lactamasas

Una vez realizada la detección fenotípica de las β -lactamasas producidas por los diferentes aislamientos se procedió a la caracterización genotípica mediante

amplificación por PCR de los genes codificantes de estas enzimas. Se evaluaron diferentes BLEE (enzimas CTX-M de los grupos 1, 2, 9, 8/25, PER-2 y SHV), AmpC (variantes CIT, DHA, EBC, MOX, AAC y FOX) y carbapenemasas (KPC y el grupo OXA-48). Dado los resultados del análisis fenotípico no se realizó la búsqueda genotípica de MBL. Las enzimas SHV (no en *K. pneumoniae*) y OXA-48 se buscaron en todos los aislamientos dada su dificultad para ser detectadas fenotípicamente.

1.1.4.1 Caracterización de BLEE

En los 50 aislamientos evaluados fue posible determinar un total de 51 BLEE, con la aclaración que 3 aislamientos de *K. pneumoniae* compartían dos clases diferentes de estas enzimas. De esta manera, hubo 2 aislamientos (1 *P. mirabilis* y 1 *E. cloacae*) que mostraron fenotipo de BLEE en los que no fue posible encontrar ninguna de las β -lactamasas ensayadas.

La distribución de BLEE encontrada fue la siguiente: 21/51 CTX-M del grupo 1, 14/51 CTX-M del grupo 2, 5/51 CTX-M del grupo 9, 1/51 CTX-M del grupo 8/25 y 10/51 PER-2. Analizando su distribución según la especie bacteriana observamos que de los 13 aislamientos de *E. coli* portadores de BLEE, se encontraron 3/13 CTX-M del grupo 1, 5/13 CTX-M del grupo 2, 4/13 CTX-M del grupo 9 y 1/13 PER-2; en los 28 aislamientos de *K. pneumoniae* portadores de BLEE se encontraron 17/28 CTX-M del grupo 1 (1 de estos aislamientos es co-portador de CTX-M del grupo 8/25 y otro de PER-2), 7/28 CTX-M del grupo 2 (1 de estos aislamientos es co-portador de PER-2), 1/28 CTX-M del grupo 9, y 5/28 PER-2 (recordar que 1 de estos aislamientos co-expresa CTX-M del grupo 1), de esta manera nos encontramos con 28 aislamientos que expresan un total de 31 BLEE; en los 4 aislamientos de *P. mirabilis* caracterizados con fenotipo de BLEE se identificaron 2/4 como productores de CTX-M del grupo 2, 1/4 como productor de PER-2 y 1/4 en el que no se detectó ninguna de las BLEE evaluadas; para los 3 aislamientos de *E. cloacae* se detectaron 1/3 CTX-M del grupo 1, 1/3 PER-2 y para el tercer aislamiento no fue posible determinar la BLEE responsable del fenotipo. En 2/2 *S. marcescens* la BLEE encontrada fue PER-2. La enzima SHV, evaluada en los aislamientos de *E. coli*, *P. mirabilis*, *E. cloacae* y *S. marcescens*, no se encontró en ninguno de ellos.

La distribución de BLEE caracterizadas genotípicamente según especie bacteriana se resume en la tabla 7.

Tabla 7: Distribución de BLEE caracterizadas genótipicamente según especie bacteriana.

Especie (N° de aislamientos)	CTX-M G1	CTX-M G2	CTX-M G9	CTX-M G8/25	PER-2	Total de BLEE caracterizadas
<i>E. coli</i> N=13	3	5	4	-	1	13
<i>K. pneumoniae</i> N=28	17	7	1	1*	5**	31
<i>Proteus</i> N=4	-	2	-	-	1	3
<i>E. cloacae</i> N=3	1	-	-	-	1	2
<i>S. marcescens</i> N=2	-	-	-	-	2	2
Total	21	14	5	1	10	51

*Enzima encontrada en un aislamiento que también es portador de CTX-M del grupo 1

**Un aislamiento es co-portador de PER-2 y CTX-M del grupo 2 y otro de PER-2 y CTX-M del grupo 1

- ausencia de la enzima evaluada

1.1.4.2 Caracterización de AmpC

En 4 aislamientos se detectaron por PCR multiplex AmpC plasmídicas de la variante CIT (CMY). Estos aislamientos fueron 3 *E. coli* y 1 *P. mirabilis*. Por otro lado, en los 6 aislamientos de *E. cloacae* se detectó la variante EBC que se corresponde con la AmpC cromosómica presente en esta especie bacteriana. El resto de las variantes (DHA, MOX, AAC, FOX) no fueron detectadas en ningún aislamiento.

1.1.4.3 Caracterización de carbapenemasas

Mediante PCR se confirmó la enzima KPC en los 3 aislamientos de *K. pneumoniae* caracterizados fenotípicamente como portadores de carbapenemasas tipo KPC. No se detectó la β -lactamasas OXA-48 en ninguno de los aislamientos resistentes a CTG.

1.1.5 Prevalencia de β -lactamasas

Sobre el total de aislamientos que presentaron resistencia a al menos una CTG el análisis fenotípico mostró que el 83,3% (50/60) (IC₉₅ 71,8% – 90,9%) se caracterizaron como productores de BLEE, 6,7% (4/60) (IC₉₅ 2,2% – 16,4%) como productores de AmpC plasmídica (AmpCp), 5,0% (3/60) (IC₉₅ 1,2% – 14,2%) como productores de KPC y 5,0% (3/60) (IC₉₅ 1,2% – 14,2%) como productores de AmpC cromosómica desreprimida (AmpCc d/p) (Figura 19).

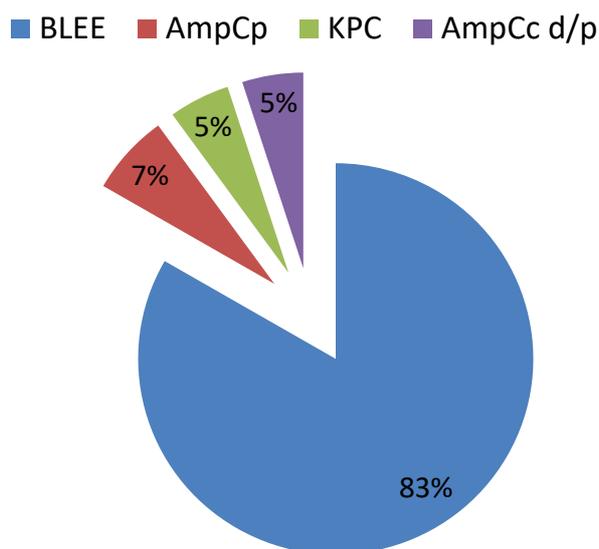


Figura 19: Distribución de tipos de β-lactamasas caracterizadas fenotípicamente en los 60 aislamientos de *Enterobacterales* con resistencia a CTG.

En los 16 aislamientos de *E. coli* se detectaron 13 BLEE y 3 AmpCp, en *K. pneumoniae* se detectaron 28 productores de BLEE y 3 de KPC, *P. mirabilis* mostró 4 productores de BLEE y 1 de AmpCp, *E. cloacae* 3 productores de BLEE y 3 con AmpC cromosómica desreprimida (AmpCc d/p) y los 2 aislamientos de *S. marcescens* mostraron fenotipo de BLEE. Estos resultados se muestran en la figura 20.

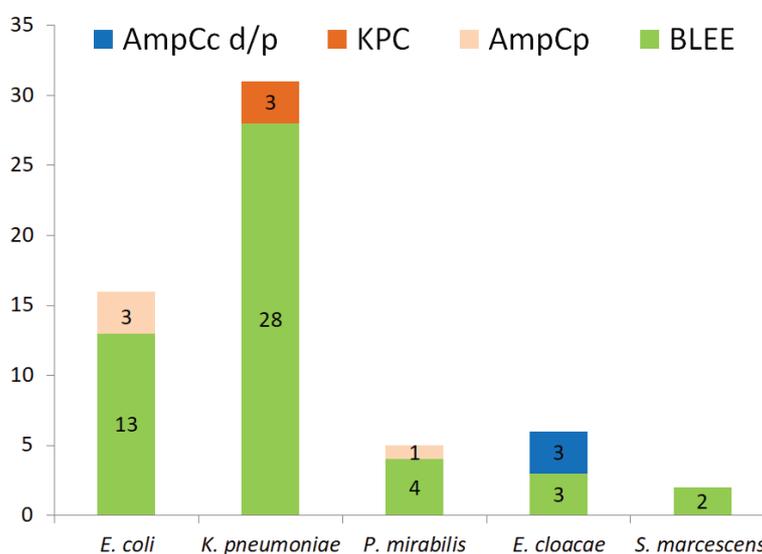


Figura 20: Distribución de tipos de β-lactamasa por especie microbiana.

Como ya se destacó, en los 50 aislamientos productores de BLEE se caracterizaron mediante PCR un total de 51 de estas enzimas, donde 3 aislamientos de *K. pneumoniae* compartían 2 de estas. A su vez, en 2 aislamientos no fue posible caracterizar la enzima responsable del fenotipo de BLEE. La BLEE mayormente

encontrada corresponde a CTX-M del grupo 1, la cual fue caracterizada en 21 aislamientos, seguida por CTX-M del grupo 2 con 14 y PER-2 en 10 aislamientos. Finalmente, CTX-M del grupo 9 aparece en 5 aislamientos y CTX-M del grupo 8/25 aparece en un único aislamiento (Figura 21).

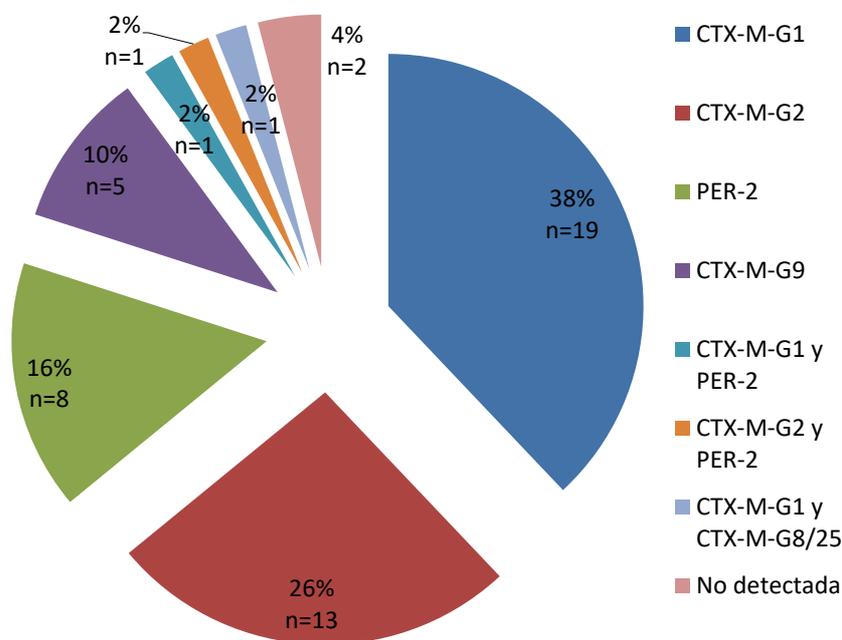


Figura 21: Distribución de BLEE determinadas por PCR en los 50 aislamientos caracterizados con este fenotipo.

Los β -lactamasas AmpC plasmídicas se detectaron en *E. coli* (3 aislamientos) y en *P. mirabilis* (1 aislamiento), las 4 fueron caracterizadas por PCR como bla_{CMY} . Por otro lado, si bien los 6 aislamientos de *E. cloacae* se caracterizaron como portadores de bla_{EBC} , los tres aislamientos BLEE negativos fueron categorizados como productores de AmpC desreprimidos, coincidiendo con el fenotipo observado.

Todos los datos correspondiente a los 60 aislamientos resistentes a CTG se resumen en la tabla 8

Tabla 8: Perfiles de sensibilidad, código, especies y origen de los aislamientos con fenotipo de resistencia a cefalosporinas de tercera generación.

Código	Especie	Muestra	AMP		CTX		CAZ		FOX		FEP		IMI		MEM		ETP		GEN	CIP	TMS	NIT
			CIM (µg/mL)	Antibiograma (mm)																		
C1	<i>E. coli</i>	Orina (A)	≥32	6	4	20	4	21	NE	14	1	32	1	28	≤0,25	29	NE	28	2	0,25	0,5/9,5	32
C2	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre (I)	≥32	6	≥64	8	16	17	NE	18	16	16	≤1	28	≤0,25	30	NE	29	≤1	2	1/19	NE
C3	<i>K. pneumoniae</i>	PyPB (I)	≥32	6	≥64	13	≥64	6	NE	11	8	14	8	17	8	12	NE	10	≥16	≥4	2/38	NE
C4	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (I)	≥32	6	≥64	7	≥64	10	NE	19	8	13	≤1	31	≤0,25	29	NE	28	≥16	≥4	2/38	64
C5	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (A)	≥32	6	≥64	6	≥64	7	NE	18	16	12	≤1	30	≤0,25	30	NE	29	≤1	≥4	0,5/9,5	256
C6	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (A)	≥32	6	≥64	15	≥64	6	NE	24	2	20	≤1	31	≤0,25	30	NE	30	≥16	≥4	2/38	16
C7	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre (I)	≥32	6	≥64	7	≥64	10	NE	24	32	15	≤1	30	≤0,25	30	NE	27	≥16	≥4	2/38	NE
C8	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre (I)	≥32	6	≥64	6	≥64	7	NE	22	32	14	≤1	30	≤0,25	30	NE	28	≥16	≥4	2/38	NE
C9	<i>K. pneumoniae</i>	BAL(I)	≥32	6	≥64	6	≥64	10	NE	20	32	11	≤1	27	≤0,25	29	NE	27	≥16	≥4	≥4/76	NE
C10	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre (I)	≥32	6	≥64	6	32	8	NE	20	32	13	≤1	27	≤0,25	27	NE	27	≤1	≥4	1/19	NE
C11	<i>E. cloacae</i>	Orina (I)	≥32	6	≥64	22	≥64	17	≥64	6	≤1	34	≤1	27	≤0,25	30	NE	28	≤1	≤0,25	1/19	64
C13	<i>P. mirabilis</i>	Orina (A)	≥32	6	64	13	2	25	NE	21	1	16	1	26	≤0,25	29	NE	29	8	2	2/38	128
C14	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (I)	≥32	6	≥64	10	32	17	NE	22	32	15	2	24	≤0,25	25	NE	28	≥16	≥4	2/38	16
C15	<i>E. coli</i>	Orina (I)	≥32	6	32	8	16	13	NE	20	32	15	≤1	32	≤0,25	28	NE	25	≤1	≥4	≥4/76	16
C16	<i>P. mirabilis</i>	Sangre (I)	≥32	6	32	15	≥64	6	NE	23	4	16	≤1	23	≤0,25	29	NE	30	4	0,5	≥4/76	NE
C17	<i>E. coli</i>	Orina (A)	≥32	6	8	13	1	24	NE	19	1	21	1	28	≤0,25	34	NE	28	8	2	0,5/9,5	32
C18	<i>E. cloacae</i>	Sangre (I)	≥32	6	≥64	10	≥64	6	NE	6	32	15	≤1	29	≤0,25	30	NE	30	≤1	2	1/19	NE

Código	Especie	Muestra	β-lactamasas		AMP	CTX	CAZ	FOX	FEP	IMI	MEM	ETP	GEN	CIP	TMS	NIT
			Antibiograma (mm)	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CIM (µg/mL)										
C19	<i>E. cloacae</i>	PyPB (l)	6	≥64	6	≥64	6	6	8	≤1	≤0,25	NE	4	≥4	≥4/76	256
C20	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre (l)	6	≥64	8	≥64	13	NE	32	≤1	≤0,25	NE	1	≥4	1/19	NE
C21	<i>P. mirabilis</i>	Sangre (l)	6	64	6	2	NE	21	16	1	≤0,25	NE	2	0,5	0,5/9,5	NE
C22	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre (l)	6	≥64	6	≥64	6	NE	32	≤1	≤0,25	NE	16	≥4	≥4/76	64
C23	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (A)	6	≥64	6	≥64	14	NE	32	≤1	≤0,25	NE	≥16	4	≥4/76	64
C24	<i>E. coli</i>	PyPB (l)	6	4	12	1	NE	20	1	20	≤0,25	NE	8	2	2/38	16
I1	<i>S. marcescens</i>	L. Ab. (l)	6	8	11	≥64	6	8	2	≤1	≤0,25	NE	≥16	2	≥4/76	128
I2	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (l)	6	≥64	8	16	13	≥64	2	≤1	≤0,25	NE	≥16	≥4	≥4/76	128
I4	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre (l)	6	≥64	7	≥64	6	≤4	2	≤1	≤0,25	NE	≥16	≥4	≥4/76	64
I7	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (l)	6	≥64	9	≥64	6	≤4	2	≤1	≤0,25	NE	≥16	1	≥4/76	32
I8	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre (l)	6	≥64	6	≥64	11	≤4	4	≤1	≤0,25	NE	≥16	≥4	≥4/76	128
I9	<i>P. mirabilis</i>	Orina (l)	6	4	21	4	22	32	1	0,25	≤0,25	NE	1	2	4/76	128
I10	<i>K. pneumoniae</i>	L. Ab. (l)	6	≥64	6	16	15	≤4	8	≤1	≤0,25	NE	≥16	≥4	≥4/76	256
I11	<i>K. pneumoniae</i>	L. Ab. (l)	6	≥64	7	≥64	9	≤4	8	≤1	≤0,25	NE	≥16	≥4	≥4/76	128
I12	<i>E. coli</i>	Orina (l)	6	16	9	4	22	≤4	2	1	≤0,25	NE	16	4	4/76	16
I15	<i>K. pneumoniae</i>	L. Pral (l)	6	≥64	6	16	15	≤4	8	≤1	≤0,25	NE	≥16	≥4	≥4/76	≥512
I17	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (l)	6	≥64	6	≥64	7	≤4	4	≤1	≤0,25	NE	≥16	≥4	≥4/76	64
I18	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (A)	6	≥64	6	16	15	≤4	8	≤1	≤0,25	NE	≥16	≥4	≥4/76	≥512
I19	<i>S. marcescens</i>	Sangre (l)	6	8	14	≥64	6	≤4	2	≤1	≤0,25	NE	≥16	2	≥4/76	128
I20	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre (l)	6	≥64	6	≥64	7	≤4	8	≤1	≤0,25	NE	≥16	≥4	≥4/76	64

Código	Especie	Muestra	β-lactamasas/s	AMP		CTX		CAZ		FOX		FEP		IMI		MEM		ETP		GEN	CIP	TMS	NIT	
				Antibiograma (mm)	CIM (µg/mL)																			
I21	<i>K. pneumoniae</i>	PyPB (A)	CTX-M-G1	≥32	6	≥64	6	≥64	6	≤4	21	8	15	29	≤1	29	≤0,25	26	NE	25	≥16	≥4	≥4/76	64
I22	<i>K. pneumoniae</i>	PyPB (I)	KPC	≥32	6	≥64	6	≥64	6	32	8	8	12	≥16	15	4	12	NE	10	≥16	≥4	0,5/9,5	256	
I23	<i>E. coli</i>	MF (I)	PER-2	≥32	6	≥64	13	≥64	6	≤4	22	2	16	≤1	30	≤0,25	30	NE	30	≤1	≥4	≥4/76	64	
I24	<i>E. coli</i>	Orina (I)	CMY	≥32	6	4	20	16	17	≥64	6	≤1	31	≤1	29	≤0,25	32	NE	29	≤1	≤0,25	≥4/76	64	
I25	<i>K. pneumoniae</i>	PyPB (I)	CTX-M-G1	≥32	6	≥64	7	16	10	≤4	20	2	15	≤1	29	≤0,25	30	NE	29	≥16	≥4	≥4/76	256	
I26	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (I)	CTX-M-G9	≥32	6	64	10	1	22	≤4	23	2	18	1	28	≤0,25	28	NE	28	1	0,25	0,5/9,5	64	
I27	<i>E. coli</i>	Orina (I)	CTX-M-G9	≥32	6	64	6	4	21	≤4	22	8	15	1	30	≤0,25	30	NE	30	1	0,25	4/76	16	
I28	<i>E. cloacae</i>	PyPB (I)	CTX-M-G1	≥32	6	≥64	6	≥64	9	≥64	6	16	10	≤1	26	≤0,25	28	NE	22	≥16	≥4	0,5/9,5	256	
N1	<i>E. coli</i>	Orina (I)	CTX-M-G2	≥32	6	64	6	4	23	NE	25	8	13	1	26	≤0,25	26	NE	25	16	0,25	4/76	32	
N2	<i>E. coli</i>	Orina (I)	CTX-M-G1	≥32	6	64	9	4	22	NE	26	2	22	1	32	≤0,25	33	NE	30	16	0,5	4/76	16	
N3	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (I)	CTX-M-G1	≥32	6	≥64	6	≥64	10	NE	20	≥64	13	≤1	30	≤0,25	30	NE	27	≥16	1	≥4/76	NE	
N4	<i>E. coli</i>	Orina (A)	CTX-M-G1	≥32	6	≥64	6	16	17	NE	26	2	17	≤1	30	≤0,25	30	NE	30	≥16	0,5	≥4/76	≤16	
N5	<i>E. cloacae</i>	Orina (I)	AmpCc d/p (EBC)	≥32	6	≥64	6	≥64	9	NE	6	≤1	28	≤1	26	≤0,25	27	NE	22	≤1	≤0,25	≥4/76	32	
N6	<i>E. cloacae</i>	Orina (I)	AmpCc d/p (EBC)	≥32	6	≥64	6	≥64	11	NE	7	≤1	27	≤1	24	≤0,25	25	NE	22	≤1	≤0,25	0,5/9,5	32	
N7	<i>K. pneumoniae</i>	Sangre (I)	KPC	≥32	6	≥64	10	≥64	6	NE	11	8	11	≥16	17	8	14	NE	11	≥16	≥4	NE	NE	
N8	<i>E. coli</i>	Orina (I)	CTX-M-G9	≥32	6	64	14	1	24	NE	27	1	25	1	34	≤0,25	39	NE	36	1	0,25	4/76	16	
N9	<i>P. mirabilis</i>	PyPB (I)	NC	≥32	6	4	22	16	17	8	21	≤1	32	≤1	24	≤0,25	26	NE	30	≤1	≤0,25	0,5/9,5	128	
N10	<i>E. coli</i>	Orina (I)	CMY	≥32	6	32	11	≥64	8	NE	6	≤1	25	≤1	28	≤0,25	30	NE	26	≥16	≥4	≥4/76	64	
N11	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (I)	PER-2	≥32	6	8	11	≥64	6	NE	25	2	17	≤1	30	≤0,25	31	NE	29	≤1	≤0,25	≥4/76	NE	
N12	<i>K. pneumoniae</i>	Orina (I)	CTX-M-G1	≥32	6	≥64	6	16	17	NE	25	2	19	≤1	30	≤0,25	31	NE	30	≥16	1	≥4/76	NE	

Código	Especie	Muestra	AMP	CTX	CAZ	FOX	FEP	IMI	MEM	ETP	GEN	CIP	TMS	NIT
N13	<i>E. coli</i>	Orina (l)	≥32 CIM (µg/mL)	6 8 Antibiograma (mm)	1 22 Antibiograma (mm)	NE 20 Antibiograma (mm)	1 19 CIM (µg/mL)	1 30 Antibiograma (mm)	≤0,25 30 Antibiograma (mm)	NE 30 CIM (µg/mL)	1 30 Antibiograma (mm)	0,25 4 CIM (µg/mL)	4/76 4/76 CIM (µg/mL)	16 16 CIM (µg/mL)
N14	<i>E. coli</i>	Orina (l)	≥32 CIM (µg/mL)	6 64 Antibiograma (mm)	4 27 Antibiograma (mm)	NE 28 Antibiograma (mm)	2 20 CIM (µg/mL)	1 30 Antibiograma (mm)	≤0,25 30 Antibiograma (mm)	NE 28 CIM (µg/mL)	4 28 Antibiograma (mm)	0,25 4 CIM (µg/mL)	4/76 4/76 CIM (µg/mL)	16 16 CIM (µg/mL)
N15	<i>E. coli</i>	Orina (l)	≥32 CIM (µg/mL)	6 64 Antibiograma (mm)	4 21 Antibiograma (mm)	NE 25 Antibiograma (mm)	4 15 CIM (µg/mL)	0,5 30 Antibiograma (mm)	≤0,25 30 Antibiograma (mm)	NE 28 CIM (µg/mL)	4 28 Antibiograma (mm)	4 4 CIM (µg/mL)	4/76 4/76 CIM (µg/mL)	64 64 CIM (µg/mL)

PyPB: piel y partes blandas

BAL: Lavado broncoalveolar

L. Ab.: Líquido abdominal

L. Pral: Líquido Pleural

MF: Materia fecal

Antibiograma: Se informa el diámetro de los halos producidos en la prueba de difusión en agar usando discos de antibióticos

CIM: Se informan los valores de concentración inhibitoria mínima obtenidos para los antibióticos ensayados

(A): Aislamiento obtenido a partir de un paciente ambulatorio

(I): Aislamiento obtenido a partir de un paciente internado

Interpretaciones: Las celdas pintadas de color anaranjado corresponde a Resistencia, y las de color amarillo a sensibilidad intermedia o

sensible dosis dependiente (SSD) para FEP

NE: No evaluado

NC: No caracterizado

1.2 Estudio retrospectivo de *Salmonella*

1.2.1 Aislamientos y distribución de serovariedades

Durante 2014, 7 hospitales de la provincia de Santa Fe enviaron un total de 52 aislamientos de *S. enterica* al LCPSF. Los aislamientos fueron recuperados de materia fecal (n= 46), sangre (n= 5) y orina (n=1). La mayoría de los aislamientos fueron caracterizados como *S. enterica* serovar Typhimurium (n=40). El resto de los aislamientos corresponden a los serotipos Newport (n=4), Enteritidis (n=3), Javiana (n=2), Agona (n=1), Infantis (n=1) y Give (n=1). Todos los aislamientos fueron agentes causales de gastroenteritis.

1.2.2 Relación clonal

Entre los 52 aislamientos recuperados se encontraron 14 de ellos (todos *S. Typhimurium*) con sospecha de brote intrahospitalario, ya que provenían de la misma institución de salud, presentaban el mismo perfil de sensibilidad y fueron recolectados en su mayoría entre septiembre y octubre de 2014 (solo uno, el aislamiento 97, fue obtenido en julio de ese año). Mediante el protocolo estandarizado de PFGE se pudo establecer la relación clonal entre estos aislamientos y determinar el pulsotipo característico (ARJPXX01.0344). Por lo tanto a estos 14 aislamientos relacionados genéticamente se los consideró como un solo clon (Figura 22). A causa de esto se procedió a estudiar aquellos aislamientos no relacionados clonalmente y se incluye 1 representante del grupo clonal (n=39).



Figura 22: Dendrograma de relación genética con la enzima primaria *XbaI* analizado con el coeficiente Dice de los 14 aislamientos de *S. Typhimurium* asociados a la sospecha de brote intrahospitalario (Remitido por el Servicio Enterobacterias INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán").

El pulsotipo ARJPXX01.0344, correspondiente a estos aislamientos no fue determinado previamente en la Base de Datos Nacional (BDN) (hasta el momento en que se realizó el ensayo en el año 2016), lo que sugiere la identificación de un nuevo subtipo clonal de *S. Typhimurium* en dicha base. Por otro lado, se realizó una comparación con otros aislamientos depositados en la BDN observando que 2 aislamientos recuperados en el año 2013 en las provincias de Córdoba y Neuquén mostraron perfiles genéticos relacionados (pulsotipo con *Xba*I ARJPXX01.0377). Estos aislamientos fueron recuperados de pacientes humanos a partir de muestras de materia fecal (Comunicación personal, María Rosa Viñas, Sección Enterobacterias - Departamento Bacteriología del INEI - ANLIS " Dr. Carlos G. Malbrán ").

1.2.3 Perfil de sensibilidad a antibióticos

El 46,1% (18/39) (IC₉₅ 31,6% – 61,4%) de los aislamientos mostraron resistencia a CTX, de los cuales 2 mostraron resistencia disociada a CTG (2/18 CAZ^R, 14/18 CAZ^I y 2/18 CAZ^S) y 2 presentaron a su vez resistencia a FOX (1 CAZ^R y 1 CAZ^S). Un total de 17/18 aislamientos se caracterizaron fenotípicamente como productores de BLEE según la prueba confirmatoria propuesta por el CLSI. En uno de los aislamientos con resistencia a CTG y a FOX se observó sinergia entre el APB y los discos de CAZ y CTX, sugiriendo la presencia de AmpCp.

Por otro lado 20/39 (51%) aislamientos se categorizaron como con sensibilidad disminuida a CIP (17 *S. Typhimurium*, 2 *S. Newport* y 1 *S. Javiana*), de los cuales 15 fueron no sensibles a NAL.

No se observó resistencia a GEN y AMK en 28/39 aislamientos donde se pudo ensayar. Los perfiles de sensibilidad y los serotipos se resumen para cada aislamiento en la tabla 9.

Con una lectura flexible, 13/18 (72%) aislamientos resistentes a CTX se categorizaron con claridad como multirresistentes (sin considerar resultados intermedios como resistentes) teniendo en cuenta el criterio del Consenso Latinoamericano para categorizar y notificar patógenos multiresistentes (Jiménez Pearson et al., 2019).

Tabla 9: Serotipos y perfiles de sensibilidad obtenidos mediante la técnica de difusión en agar para los 39 aislamientos de *S. enterica*.

Código	Serotipo	Muestra	Diámetro del halo medido en milímetros (mm).													
			AMP	AMS	CFZ	CTX	CAZ	FEP	FOX	NAL	CIP	TMS	CMP	TET	GEN	AMK
8	Typhimurium	M. Fecal	20	21	23	27	NE	30	21	22	34	24	25	NE	NE	NE
9*	Typhimurium	M. Fecal	6	8	6	10	20	15	24	12	27	6	6	6	26	21
10	Typhimurium	M. Fecal	6	12	23	28	NE	30	29	6	25	6	6	6	25	20
11	Typhimurium	M. Fecal	6	19	24	34	NE	32	24	6	24	6	6	6	24	22
13	Agona	M. Fecal	22	22	24	27	NE	28	24	21	35	22	23	NE	NE	NE
14*	Typhimurium	M. Fecal	6	7	6	9	20	16	24	13	26	6	6	6	25	23
30	Newport	M. Fecal	20	21	23	28	NE	26	25	20	26	20	21	18	24	21
37	Typhimurium	M. Fecal	6	12	13	35	NE	34	25	6	24	6	6	6	24	21
45	Typhimurium	M. Fecal	6	14	25	30	NE	30	24	9	25	6	6	6	30	24
48**	Typhimurium	M. Fecal	6	8	6	15	7	27	13	23	34	24	24	19	24	20
51	Typhimurium	M. Fecal	6	8	6	11	21	15	11	24	36	6	6	6	27	23
52	Infantis	M. Fecal	6	8	6	9	20	15	24	23	35	6	6	6	29	29
53	Typhimurium	M. Fecal	6	9	6	10	20	17	25	24	36	6	6	6	24	21
54	Typhimurium	Sangre	22	23	24	35	NE	34	25	15	27	27	25	6	25	23
59	Javiana	M. Fecal	21	21	24	29	NE	30	21	22	33	22	24	NE	NE	NE
64	Newport	M. Fecal	22	29	25	26	NE	32	26	22	28	22	25	19	25	21
65	Newport	Orina	6	14	20	32	NE	30	25	25	38	26	6	NE	NE	NE
68	Typhimurium	M. Fecal	6	12	23	30	NE	31	21	12	28	20	25	6	25	21
71	Typhimurium	M. Fecal	6	8	6	10	19	14	26	21	36	6	6	6	26	22
73	Newport	M. Fecal	6	9	6	8	19	14	30	25	36	6	6	6	25	22
74	Typhimurium	M. Fecal	6	8	6	9	18	14	24	24	34	6	6	6	24	21
79	Typhimurium	Sangre	6	7	6	17	6	13	25	15	28	27	26	20	25	21
93	Javiana	M. Fecal	6	15	6	15	6	22	25	19	27	25	26	20	23	18
95	Typhimurium	M. Fecal	6	8	6	6	18	14	26	25	36	26	27	6	25	22
97	Typhimurium	Sangre	6	14	6	7	17	19	24	14	29	25	26	21	25	21
114	Typhimurium	M. Fecal	24	26	25	32	NE	33	26	25	36	27	25	NE	NE	NE
120	Enteritidis	M. Fecal	6	19	24	35	NE	38	27	25	39	28	27	NE	NE	NE
166	Enteritidis	M. Fecal	20	22	23	34	NE	34	18	22	38	22	27	NE	NE	NE
167	Enteritidis	M. Fecal	23	25	24	34	NE	17	26	23	38	26	28	NE	NE	NE
173	Typhimurium	M. Fecal	6	10	6	10	19	16	26	14	30	22	26	6	27	24
187	Typhimurium	Sangre	6	15	23	35	NE	38	26	12	29	6	6	6	27	23
188*	Typhimurium	Orina	6	10	6	10	21	17	25	12	13	6	6	6	26	24
191	Typhimurium	M. Fecal	24	25	23	31	NE	33	25	22	25	25	26	21	30	23

Código	Serotipo	Muestra	Diámetro del halo medido en milímetros (mm).													
			AMP	AMS	CFZ	CTX	CAZ	FEP	FOX	NAL	CIP	TMS	CMP	TET	GEN	AMK
194*	Typhimurium	M. Fecal	6	8	6	9	19	12	25	15	30	6	6	6	25	22
195*	Typhimurium	M. Fecal	6	9	6	8	20	9	26	26	30	6	6	6	28	25
196	Typhimurium	M. Fecal	25	30	32	37	NE	34	27	26	36	28	30	NE	NE	NE
197	Give	M. Fecal	25	26	25	36	NE	34	26	24	40	26	27	NE	NE	NE
198*	Typhimurium	Sangre	6	11	6	10	19	18	28	14	30	6	6	6	30	16
199	Typhimurium	M. Fecal	6	9	25	36	NE	32	29	11	34	24	29	NE	NE	NE

* Aislamientos productores de CTX-M-14

** Aislamiento producto de CMY-2

M. Fecal: Materia fecal

Interpretaciones: Las celdas pintadas de color anaranjado corresponde a Resistencia, y las de color amarillo a sensibilidad intermedia o SSD para FEP

NE: No evaluado

1.2.4 Caracterización genotípica de β -lactamasas

En los 17 aislamientos caracterizados fenotípicamente como portadores de BLEE (95%) se determinó que las enzimas responsables pertenecían exclusivamente a las CTX-M del grupo 9. El 82% (14/17) de los aislamientos productores de BLEE corresponden a *S. enterica* serovariedad Typhimurium, el resto pertenecen a las serovariedades Javiana, Infantis y Newport.

En el aislamiento caracterizado como portador de AmpC plasmídica se confirmó la presencia de una variante tipo CMY; el serotipo correspondiente a este aislamiento fue *S. enterica* serovariedad Typhimurium.

DISCUSIÓN

1.1 Estudio prospectivo de *Enterobacterales* con resistencia a CTG

1.1.1 *E. coli* y *K. pneumoniae* los *Enterobacterales* más prevalentes

La capacidad de los miembros del orden *Enterobacterales* para causar enfermedades es muy variable y engloba microbiota comensal (que raras veces es perjudicial), patógenos oportunistas susceptibles de ocasionar una morbi-mortalidad considerable en hospedadores comprometidos y patógenos potentes, capaces de provocar enfermedades en personas en perfecto estado de salud (Donnenberg, 2012). *E. coli* (68%) aparece como la principal especie causal de infecciones seguida por *K. pneumoniae* (15%) y *Proteus* spp. (8%). Estos resultados se correlacionan con que *E. coli* es la especie con mayor prevalencia en causar cuadros infecciosos dentro de las enterobacterias (Puerta-García & Mateos-Rodríguez, 2010), y esta elevada tasa de infecciones se debe a su tremenda versatilidad de mecanismos que posee esta especie para causar enfermedades, tales como neumonía nosocomial, colecistitis y colangitis, gastroenteritis, peritonitis, celulitis, osteomielitis y artritis infecciosa (Donnenberg, 2012). Sin embargo, su mayor incidencia se da en infecciones del tracto urinario (ITU), donde se utiliza el término de cepas uropatogénicas para describir a los aislamientos causales. Las cepas uropatogénicas de *E. coli* tienen factores de virulencia que favorecen la ITU (Donnenberg, 2012).

Por su parte, *K. pneumoniae* es una bacteria capaz de causar ITU, absceso hepático y neumonía en personas saludables. Sin embargo, la mayoría de las infecciones causadas por esta especie son adquiridas en el ambiente hospitalario y por lo general ocurren en pacientes debilitados por varias enfermedades subyacentes (Donnenberg, 2012). Aparte de ITU, las infecciones nosocomiales causadas por *K. pneumoniae* engloban infecciones en heridas, infecciones de dispositivos intravasculares y otros dispositivos invasivos, infecciones de las vías biliares, peritonitis y meningitis. *K. pneumoniae* puede producir ITU en individuos con tractos urinarios normales (Donnenberg, 2012), y es segunda, solo después de *E. coli*, en prevalencia en aislamientos nosocomiales como se observa en nuestros resultados.

En el tercer lugar en prevalencia en este estudio aparece *Proteus* spp., que al igual a lo descrito previamente, *P. mirabilis* y *P. vulgaris* representan la mayoría de los aislamientos clínicos de este género. *Proteus* spp. es causa común de ITU en personas sanas y con mayor frecuencia en aquellas con catéteres insertados o anomalías anatómicas o funcionales del tracto urinario. Por otro lado, las ITU causadas por *Proteus* spp. tienden a ser más graves que las producidas por *E. coli*,

con una proporción superior que representa pielonefritis. Puede ser aislado del torrente sanguíneo y puede ser la segunda causa de bacteriemia derivada de ITU, solo después de *E. coli* (Donnenberg, 2012).

Esta relación en las cantidades entre las bacterias aisladas en este estudio es similar a la observada en otros relevamientos, donde *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Proteus* spp. se presentan como los principales agentes infecciosos entre los *Enterobacterales* caracterizados (Gales et al., 2012; Quinteros et al., 2003; Sennati et al., 2012).

Otros géneros y especies presentaron menores porcentajes de prevalencia entre los aislamientos totales. En este grupo se incluyen *Enterobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Providencia*. De forma similar a lo que ocurre con *E. coli* y *K. pneumoniae* las cepas de *Enterobacter* surgen a menudo de la microbiota intestinal endógena de enfermos hospitalizados, pero pueden aparecer en brotes de fuentes comunes o se diseminan de paciente a paciente (Donnenberg, 2012). Las infecciones por *Enterobacter* se producen por lo general, en pacientes que han recibido tratamiento antibiótico previo y en los internados en unidades de cuidados intensivos (Sanders & Sanders, 1997), por lo que no es de sorprender que los aislamientos resistentes a CTG obtenidos en este trabajo provengan de pacientes hospitalizados. *Enterobacter* spp. pueden causar una amplia variedad de infecciones nosocomiales, entre ellas neumonía, ITU, infecciones de heridas y quemaduras, infecciones de dispositivos intravasculares o protésicos y meningitis. *E. cloacae*, *E. aerogenes* (ahora *K. aerogenes*) y *E. sakazakii*, son responsables de la amplia mayoría de infecciones registradas causadas por este género (Donnenberg, 2012), lo que es consistente con nuestros resultados.

S. marcescens está diseminada en el medio ambiente, pero no es un integrante común de la microbiota fecal humana. Por tanto, la mayoría de las infecciones se adquiere de manera exógena. Esto explica en parte, la baja prevalencia de esta especie sobre el total de los aislamientos registrados. Por otro lado, esta bacteria puede sobrevivir en condiciones hostiles, incluso en ciertos desinfectantes y soluciones de uso hospitalario, por lo que las infecciones causadas por *S. marcescens* suelen ser exógenas, ya que pueden sobrevivir en diferentes fómites y diseminarse dentro de los hospitales mediante las manos del personal. Se lo considera un microorganismo indicador de deficiente higiene institucional o falta de cumplimiento de las normas del control de infecciones. Se aísla principalmente de orina pero también puede provenir de infecciones respiratorias o de piel y partes blandas (Donnenberg, 2012). Los aislamientos de *S. marcescens* con resistencia a CTG en nuestro trabajo fueron obtenidos de muestras de sangre y de líquido abdominal.

1.1.2 Prevalencia de *Enterobacterales* resistentes a CTG

La prevalencia del 8,89% de aislamientos de *Enterobacterales* resistentes a CTG obtenida en nuestro estudio se encuentra por debajo del 13% evaluado y reportado para el año 2010 a nivel nacional (Sennati et al., 2012). Esta diferencia en el porcentaje de resistencia entre ambos relevamientos debe ser analizada cuidadosamente ya que la reducción observada puede relacionarse con un número de aislamientos menor en el presente estudio (675 frente a 1586), o con diferencias epidemiológicas de orden geográfico ya que nuestro estudio se focalizó en la ciudad de Santa Fe mientras que el relevamiento realizado por Sennati et al. (2012) es a nivel nacional. Lamentablemente, en su trabajo no se discriminan los porcentajes de prevalencia por región. Por otro lado, la prevalencia obtenida se asemeja más al 9% obtenido en 2003 en Buenos Aires (Quinteros et al., 2003).

Por su parte, la ReLAVRA publica informes de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos elaborados por el Servicio Antimicrobianos del INEI a partir de los datos Nacionales provenientes de la Red WHONET (Argentina). En estos informes se observa a partir del año 2014 en *Enterobacterales* aislados de pacientes hospitalizados (a diferencia de nuestro estudio que incluye también ambulatorios) un incremento constante en la resistencia tanto a CTX como a CAZ. De esta manera, se registran porcentajes de resistencia a CTX para el año 2014 del 25%, en 2015 del 32%, en 2017 del 39%, en 2018 del 40% y para el año 2019 del 41%. Algo semejante sucede al analizar CAZ, donde en 2014 se observa un 20% de resistencia, llegando a 41% en el año 2019 (ReLAVRA-OPS, s.f.).

Los valores informados en estos relevamientos muestran un marcado aumento de aislamientos de *Enterobacterales* resistentes a CTG en nuestro país.

Sin embargo, al evaluar los informes de ReLAVRA, se observa que la diferencia entre los porcentajes de resistencia entre CTX y CAZ disminuye con el correr de los años (2014 5%, 2015 2%, 2017 4%, 2018 1,3% y para 2019 no hay diferencia) lo que probablemente esté relacionado con un cambio en la prevalencia de las variantes CTX-M, desplazando a otras cefotaximas. El fenotipo CTX^R y CAZ^S se abordará con mayor detalle en el siguiente capítulo.

A su vez, se observa una alta prevalencia de *E. coli* como el principal agente causal de infecciones (68% sobre un total de 675 aislamientos), sin embargo, cuando el grupo de aislamientos bajo análisis se reduce a aquellos con resistencia a cualquier CTG, *K. pneumoniae* es la enterobacteria con mayor incidencia (52% sobre un total de 60 aislamientos). Este comportamiento también ha sido observado en otros relevamientos similares (Quinteros et al., 2003; Sennati et al., 2012), en informes de

ReLAVRA y está ampliamente documentado (Beigverdi et al., 2019; Paterson & Bonomo, 2005). Esto puede ser explicado por un lado, debido a la presencia de factores de virulencia específicos que facilitan la adherencia al hospedador y contribuyen a la persistencia de *K. pneumoniae* (Donnenberg, 2012). Por otro, esta especie posee un contexto genético que permite una excelente expresión de β -lactamasas unido a la elevada transmisión de genes que confieren resistencia a CTG mediante plásmidos y transposones. La evidencia muestra que la transferencia horizontal de genes a través de plásmidos de tipo IncF juega un papel importante en la diseminación de genes CTX-M entre *K. pneumoniae* (Bevan et al., 2017; Canton et al., 2012). Otra razón de este aumento en la prevalencia de aislamientos de *K. pneumoniae* probablemente esté relacionada con la propagación de clones exitosos principalmente en el ambiente intrahospitalario (Beigverdi et al., 2019; Canton et al., 2012). Otra cuestión que aporta a la selección, supervivencia y persistencia de determinados aislamientos tiene que ver con la co-resistencia y la multiresistencia a otros grupos de agentes antimicrobianos diferentes a los β -lactámicos (Canton et al., 2012), lo que es una característica habitual en *K. pneumoniae* (Jiménez Pearson et al., 2019). Estas observaciones ejemplifican el concepto de capitalismo genético por el cual los organismos resistentes tienden a ser más resistentes (Baquero, 2004).

1.1.3 Las principales BLEE: CTX-M del grupo 1 y CTX-M del grupo 2

El 83,3% de los aislamientos resistentes a cualquier CTG fue caracterizado fenotípicamente como productor de BLEE. Las principales especies en portar este tipo de β -lactamasas fueron *K. pneumoniae* (56%) y *E. coli* (26%). Relaciones semejantes entre ambas especies se observan en estudios previos llevados a cabo en nuestro país para aislamientos productores de BLEE (Quinteros et al., 2003; Sennati et al., 2012). Las BLEE de tipo CTX-M han alcanzado proporciones endémicas en América del Sur y en el resto del mundo (Canton & Coque, 2006); este fenómeno se debe principalmente a la diseminación de elementos genéticos móviles asociados a estos marcadores de resistencia, principalmente plásmidos conjugativos pertenecientes a grupos de incompatibilidad clásicos. Otro factor implicado en las altas tasas de prevalencia de *K. pneumoniae* y *E. coli* portadores de BLEE es la dispersión de clones específicos (Salles et al., 2013). El carácter endémico que presentan las enzimas tipo CTX-M en nuestra región se ve reflejado en nuestros resultados donde el 80% de las BLEE caracterizadas corresponden a CTX-M. A su vez, con un 41% las enzimas CTX-M del grupo 1 son las de mayor prevalencia seguidas por CTX-M del grupo 2 con el 27% de los aislamientos productores de BLEE. Esto está en consonancia con el

desplazamiento observado a partir del año 2010 donde CTX-M-15 se convirtió en la BLEE de mayor prevalencia en Argentina, relegando a CTX-M-2 al segundo lugar (Sennati et al., 2012). Desde la emergencia de las enzimas CTX-M, en la Argentina, CTX-M-2 siempre fue la BLEE de mayor prevalencia (Quinteros et al., 2003). La enzima CTX-M-15 está ampliamente distribuida a nivel mundial en *K. pneumoniae* y *E. coli*, convirtiéndose en una de las principales causas de amenaza en las infecciones tanto en la comunidad como en los hospitales. Para explicar este fenómeno, se ha propuesto que los factores de virulencia de las diferentes cepas podrían estar involucrados en este proceso de diseminación. De hecho, se ha demostrado que CTX-M-15 está estrechamente asociada con el clon O25:H4-ST131 uropatógeno internacional y pandémico de *E. coli*, que tiene factores de virulencia específicos (Mnif et al., 2013). A su vez, se suma la asociación de CTX-M-15 con los plásmidos IncF, que están bien adaptados y puede facilitar la propagación de este determinante en la población de *E. coli* (Canton et al., 2012). Además de los antecedentes de virulencia y los plásmidos IncF que llevan CTX-M-15, se sugirió recientemente que la asociación de varios sistemas de adicción a los plásmidos (sistemas toxina-antitoxina) puede contribuir al mantenimiento del plásmido en su hospedador (Mnif et al., 2013). Por otro lado, se han descrito clones exitosos de *K. pneumoniae* portadores de CTX-M-15 (ST11, ST15 y ST147) (Canton et al., 2012), que son capaces de generar brotes intrahospitalarios importantes, donde también se observó que el gen *bla*_{CTX-M-15} se asocia a grandes plásmidos transferibles (Dedeic-Ljubovic et al., 2010), lo que sin dudas favorece la diseminación de este marcador de resistencia.

1.1.4 CMY la única AmpC plasmídica detectada

Se encontraron β -lactamasas AmpC plasmídicas en solo 4 aislamientos, lo que corresponde a una prevalencia del 0,6%, un valor semejante al observado en otros estudios realizados en nuestro país (Cejas et al., 2012; Jure et al., 2011). Todos los aislamientos caracterizados como productores de AmpC plasmídicas (3 *E. coli* y *P. mirabilis* 1) eran portadores del gen *bla*_{CMY} lo que representa una prevalencia cercana a la reportada en el año 2012 (0,8%) (Cejas et al., 2012). A pesar del creciente reconocimiento de las β -lactamasas CMY en todo el mundo, estas enzimas no se informaron en Argentina hasta 2006 en un aislamiento de *S. flexneri* productor de CMY-2 (Rapoport et al., 2008).

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, las β -lactamasas AmpC plasmídicas son el segundo mecanismo más relevante de resistencia a CTG después

de las BLEE, en consonancia con lo descrito a nivel mundial en *Enterobacterales* (Meini et al., 2019).

Por otro lado, no se han detectado AmpC plasmídicas en este trabajo en aislamientos de *K. pneumoniae*, como si se ha observado en otros estudios a nivel local (Cejas et al., 2012) o en el resto del mundo (Arena et al., 2013; Gupta et al., 2012; Jacoby, 2009; Liu & Liu, 2016).

1.1.5 Solamente serino-carbapenemasas (KPC)

La prevalencia de aislamientos resistentes a carbapenemes fue del 0,44%, todos *K. pneumoniae*. El marcador responsable de este fenotipo fue la carbapenemasa KPC en todos los casos. A nivel mundial la incidencia de este grupo de enzimas se encuentra en constante aumento (Lespada et al., 2018). En Argentina, los primeros hallazgos de *K. pneumoniae* productores de KPC se produjeron a finales del año 2006 para luego diseminarse rápidamente alcanzando proporciones epidémicas en toda la extensión del territorio (Pasteran et al., 2008). Entre los años 2015-2017 los valores de prevalencia en *Enterobacterales* productores de carbapenemasas aislados de pacientes internados se incrementaron del 3 al 6% (Muñoz et al., 2019). Esta tendencia se mantiene en el tiempo si se tienen en cuenta los valores de resistencia a carbapenemes en aislamientos intrahospitalarios relevados por la ReLAVRA para el año 2019, con porcentajes cercanos al 11% (ReLAVRA-OPS, s.f.).

Por otro lado, nuestro trabajo no mostró aislamientos productores de MBL ni de carbapenemasas de la familia de las OXA, si bien estas familias de enzimas fueron detectadas en otros estudios (Gomez et al., 2011; Lascols et al., 2013; Poirel et al., 2011). Sin embargo, hay que tener en cuenta que al momento del relevamiento las MBL estaban frecuentemente asociadas a *P. aeruginosa* (Kali et al., 2013) y no así a *Enterobacterales*. En la actualidad, las MBL del tipo NDM (principalmente NDM-1 y NDM-5) están tomando gran relevancia en los aislamientos clínicos de *Enterobacterales* con resistencia a carbapenemes en nuestro país (Costa, Figueroa-Espinosa, et al., 2021). La situación actual a nivel nacional en cuanto a carbapenemasas está marcada por el alerta epidemiológica emitido este año por el INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbran" a raíz de la presencia de aislamientos productores de 2 carbapenemasas de manera conjunta (KPC y MBL), situación preocupante que ya se ha observado en hospitales de la ciudad de Santa Fe, en infecciones asociadas a respirador, sobre todo en el contexto pandémico actual ocasionado por COVID-19 (comunicación personal, Bioq. Ma. Fernanda Argarañá,

Hospital “J.B. Iturraspe”, Santa Fe) y también en otras regiones del país desde el año 2019 (Cejas et al., 2019; Costa, Calza, et al., 2021).

1.2 Estudio retrospectivo de *Salmonella*

S. enterica serovar Typhimurium fue la serovariedad predominante durante el periodo evaluado, al igual que lo informado en un estudio similar realizado en la región (Cordeiro et al., 2016), aunque, en general, esta serovariedad suele ser la segunda en prevalencia detrás de *S. Enteritidis* (Eng et al., 2015); sin embargo, últimamente esta tendencia se ha ido revirtiendo, y en los informes actuales de la ReLAVRA la serovariedad Typhimurium aparece como la predominante (ReLAVRA-OPS, s.f.).

El 46% de los aislamientos estudiados mostraron resistencia a las CTG, siendo las BLEE el principal mecanismo causal de este fenotipo. Este valor, se encuentra muy por encima de los porcentajes de resistencia a CTG informados por la ReLAVRA y en otro relevamiento a nivel nacional (Lucero et al., 2019), sin embargo, debemos tener en cuenta que varios laboratorios de la región solo remiten muestras al LCPSF ante la presencia de aislamientos resistentes por lo que resulta comprensible que este resultado tenga un importante sesgo.

En todos los casos, las cefotaximasas CTX-M del grupo 9 fueron las BLEE caracterizadas. La asociación entre *S. enterica* y CTX-M-14 (como miembro de las CTX-M del grupo 9) ha sido observada en Uruguay (Cordeiro et al., 2016), pero no hasta este momento en nuestro país. Si bien *S. enterica* serovar Typhimurium fue el serotipo predominante portador de CTX-M del grupo 9 también se describió en otros serotipos menos frecuentes. En contraste con nuestros resultados, en Argentina, al momento de nuestro estudio, el perfil de cefotaximasas predominantemente hallado en *S. enterica* corresponde a enzimas CTX-M del grupo 2 (Jure et al., 2010). Sin embargo, en otros países como China (Tian et al., 2016) y la India (Muthurulandi Sethuvel et al., 2015) se observó que CTX-M-14 aparece como el principal marcador de resistencia a CTG en aislamientos de *S. enterica* obtenidos de diarreas de diferentes pacientes.

Los resultados obtenidos en relación a la alta prevalencia CTX-M del grupo 9 en los aislamientos estudiados, donde a su vez, no se observó la presencia de otras variantes de CTX-M, generalmente de mayor prevalencia entre diferentes *Enterobacterales* en Argentina (Quinteros et al., 2003; Sennati et al., 2012), podría implicar un escenario epidemiológico completamente diferente en esta especie, en el cual aparezcan CTX-M del grupo 9 como las principales BLEE entre los aislamientos de *S. enterica* resistentes a CTG.

Finalmente, es pertinente mencionar que un aislamiento fue productor de AmpC plasmídica tipo CMY, mecanismo que ya había sido informado previamente en nuestro país para un aislamiento de *S. entérica* serovariedad Heidelberg (Cejas et al., 2014).

CAPÍTULO 2

**Resistencia disociada a cefalosporinas
de tercera generación y caracterización
plasmídica**

CAPÍTULO 2: Resistencia disociada a cefalosporinas de tercera generación y caracterización plasmídica

INTRODUCCIÓN

2.1 Resistencia disociada. Definición y antecedentes

El término resistencia disociada utilizado en este trabajo hace referencia al fenotipo donde determinados aislamientos muestran resistencia a un antibiótico y sensibilidad a otro antibiótico del mismo grupo o familia. Esta acepción fue introducida por Garrod en 1957 para describir cepas de *Staphylococcus* las cuales eran resistentes a eritromicina, pero sensibles al efecto de antibióticos relacionados. El fenotipo de resistencia disociada observado en macrólidos (denominado fenotipo M) es debido al mecanismo de eflujo mediado por bombas de eliminación del antibiótico al exterior de la célula (Tait-Kamradt et al., 1997). Las bacterias con este fenotipo presentan resistencia a macrólidos de 14 y 15 átomos de carbono, como eritromicina y azitromicina, y sensibilidad a macrólidos de 16 átomos, como josamicina o midecamicina, y también a lincosamidas y estreptograminas (Clancy et al., 1997; Clancy et al., 1996).

También se ha observado resistencia disociada en aislamientos de *Enterobacterales* y *Staphylococcus* para antibióticos de la familia de la fluoroquinolonas (Thomson & Sanders, 1994).

A su vez, en un estudio se analizó este perfil de resistencia entre cefalosporinas de segunda generación, particularmente cefoxitina y cefuroxima (Waterworth & Emmerson, 1979).

2.1.2 Resistencia disociada en cefalosporinas de tercera generación

2.1.2.1 Antecedentes

El fenotipo de resistencia disociada para CTG se observó en primera instancia conjuntamente con la aparición de las enzimas tipo CTX-M en Alemania (Bauernfeind et al., 1990) y Argentina (Bauernfeind et al., 1992). En Munich durante 1989 fue caracterizado un aislamiento de *E. coli* productor de CTX-M con un perfil de resistencia a cefotaxima y sensibilidad a ceftazidima. Paralelamente, un aislamiento de *S. Typhimurium* fue caracterizado con el mismo perfil en Argentina. Las enzimas responsables se nombraron como CTX-M-1 y CTX-M-2 respectivamente.

Las enzimas codificadas por este grupo de genes *bla*_{CTX-M} mostraban mayor capacidad hidrolítica sobre cefotaxima con respecto a ceftazidima. Sin embargo,

desde un punto de vista evolutivo, CTX-M como otras BLEE, divergieron posteriormente por mutaciones puntuales probablemente como consecuencia de la presión selectiva de antibióticos, lo que dio a estas enzimas la oportunidad de mejorar la actividad hidrolítica frente a ceftazidima en las nuevas variantes descritas (Poirel et al., 2008).

2.1.2.2 Fenotipos disociados y marcadores en aislamientos resistentes a CTG

Los fenotipos de resistencia disociada a CTG que se pueden observar en diferentes aislamientos son de dos tipos: 1) resistencia a cefotaxima (o ceftriaxona) (CTX^R) y sensibilidad a ceftazidima (CAZ^S); 2) resistencia a ceftazidima (CAZ^R) y sensibilidad a cefotaxima (o ceftriaxona) (CTX^S).

Como se mencionó previamente, el perfil CTX^R y CAZ^S ha sido asociado a enzimas del tipo CTX-M en aislamientos de *E. coli* (Bauernfeind et al., 1990) y *Salmonella* (Bauernfeind et al., 1992), este grupo de enzimas reciben el nombre de “cefotaximasas” debido a su mayor afinidad por cefotaxima. Otras variantes que pueden mostrar este perfil son CTX-M-14 (Liao et al., 2015) y CTX-M-3 (Zhao et al., 2014) principalmente cuando se encuentran asociadas a *E. coli*. Por otro lado, aunque en menor medida se han encontrado aislamientos productores de CMY-2 (AmpC plasmídica) que muestran este perfil disociado de resistencia (según puntos de corte actuales del *Clinical and Laboratory Standards Institute*), pero en este caso mostrando un perfil de hidrólisis homogéneo sobre las CTG (Lin et al., 2019; Seo et al., 2019).

El fenotipo CAZ^R y CTX^S es menos frecuente y está asociado a β -lactamasas derivadas de enzimas TEM (Chanal et al., 1989) y VEB-1 (Girlich et al., 2001).

2.1.2.3 Epidemiología

La proporción de aislamientos con fenotipo de resistencia disociada es relativamente baja en comparación con aquellos que muestran una resistencia neta a ambas CTG. Las regiones geográficas que presentan una mayor prevalencia de aislamientos con fenotipos CTX^R y CAZ^S son aquellas donde la circulación de enzimas CTX-M-15 no es exclusiva (Bevan et al., 2017).

2.1.2.4 Implicancias terapéuticas

Las pruebas de sensibilidad *in vitro*, empleadas para predecir el comportamiento de los microorganismos frente a algunos β -lactámicos, pueden ser inconclusas, y por lo tanto, suelen ser necesarias pruebas adicionales para detectar el/los mecanismo/s de resistencia involucrado/s, a fin de que los informes de

sensibilidad puedan ser fidedignos y proteger la seguridad del paciente (Thomson, 2010). Hasta el año 2010 el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) recomendaba ensayos que involucraban la evaluación de sinergia entre CTG e inhibidores clásicos de β -lactamasas para detectar la producción de BLEE en aislamientos que mostraran fenotipo de resistencia a cefotaxima o ceftazidima. La sospecha de la presencia de estas β -lactamasas implicaba informar al aislamiento como resistente a todos los β -lactámicos a excepción de los carbapenemes (CLSI, 2009). En contra punto a este criterio, a partir de enero de 2010, el CLSI ha publicado nuevos puntos de corte para algunas clases de cefalosporinas y otros β -lactámicos (CLSI, 2010); además, propone que utilizando estos nuevos puntos de corte en *Enterobacterales*, no es necesario la realización de pruebas sistemáticas adicionales para búsqueda de BLEE antes de informar los resultados frente a las cefalosporinas, penicilinas y aztreonam, ni modificarlos si se está en presencia de estas enzimas. Por otro lado, el CLSI menciona que estas enzimas sólo se deban buscar, a efectos de vigilancia epidemiológica o de control de infecciones. El peligro inherente a este enfoque es que algunos mecanismos de resistencia pueden no ser reconocidos, y resultan sensibles en las pruebas de rutina lo cual podría derivar en resultados clínicos adversos al administrar antibióticos inapropiados.

En un principio se podría inferir que estos lineamientos no afectarían significativamente el reporte de aislamientos no productores de BLEE, pero se observaría un incremento en los informes de sensibilidad a ceftazidima en aquellos aislamientos productores de BLEE de tipo cefotaximasas debido a la diferente afinidad de estas enzimas frente a las CTG de uso corriente en el tratamiento clínico: cefotaxima y ceftazidima.

Actualmente se considera que no se disponen de suficientes trabajos científicos que avalen el uso de estos nuevos criterios a la hora de la selección de la terapia antibiótica; en particular, en contextos epidemiológicos de cefotaximasas, como el observado en nuestro país y en las otras regiones del mundo mencionadas previamente.

Los países de desarrollo intermedio, tales como Argentina, suelen ser cuantitativamente los más afectados por la emergencia de mecanismos de resistencia, dado que, si bien acceden a tratamientos antibióticos con drogas de reserva, existe una pobre vigilancia o empleo de medidas de control de la resistencia. En la actualidad, uno de los pocos recursos terapéuticos existentes para el tratamiento de microorganismos productores de BLEE son los carbapenemes.

2.2 Clasificación y caracterización de plásmidos

2.2.1 Tamaño y número de copias

Los plásmidos se replican de forma autónoma del cromosoma bacteriano y suelen estar presentes en más de una copia por célula. Tienen sistemas que garantizan su replicación autónoma pero también tienen mecanismos que controlan su número de copias y aseguran una herencia estable durante la división celular (Carattoli, 2009). La parte esencial de un plásmido que determina principalmente su número de copias es el sistema de replicación, en la mayoría de los casos está compuesto por un origen de replicación vegetativo (*oriV*) y un gen que codifica la proteína de inicio de replicación (*rep*) (Jahn et al., 2016). Esta parte es conocida como replicón básico y permite que muchos plásmidos se mantengan de manera estable en su número de copias característico dentro de la creciente población bacteriana, controlando su concentración y regulando la tasa de replicación (Carattoli, 2011). En principio, se podría pensar que un bajo número de copias plasmídicas promueve el fallo en la distribución del plásmido a las células hijas, mientras que se supone que un número de copias más alto asegura que cada hija obtenga moléculas de plásmido, pero, por lo general el comportamiento de los plásmidos de bajo número de copias se caracteriza por sistemas de partición activos para asegurar la distribución fiel de una o pocas copias de plásmidos de las células madre a las células hijas (Jahn et al., 2016). Los plásmidos con alto número de copias se segregan principalmente por difusión aleatoria (Munch et al., 2019). El número de copias representa el dígito de plásmidos que se presentan en una célula bacteriana. Por lo general, para plásmidos de gran tamaño hay un menor número de copias (1 o 2 copias por célula), pero para plásmidos chicos existe un número de copias mayor (50 a 800 copias por célula). Los plásmidos son de diferentes tamaños, los más chicos, que presentan uno o pocos genes, y los más grandes pueden llegar a tener 500 genes (Smillie et al., 2010). La longitud de un plásmido varía entre unos pocos Kb a unos 250 Kb (1000 a 250.000 pb) (Munch et al., 2019). Se han observado amplias variaciones tanto en el tamaño como en el contenido de GC entre los 4602 plásmidos encontrados en la base de datos de *GenBank*. El tamaño promedio fue de 80 kb, y el contenido de GC promedio fue 44.1% (rango: 19.3-75.6%) (Shintani et al., 2015).

2.2.2 Plásmidos conjugativos y movilizables

Los plásmidos también pueden ser agrupados en tres grupos según su habilidad para movilizarse entre células: 1) conjugativos o auto-transferibles, 2) movilizables y 3) no movilizables. Los plásmidos conjugativos portan los genes *tra*

responsables de la conjugación y la transferencia de los plásmidos hacia otra célula (Bennett, 2008). Los plásmidos movilizables se clasifican como no conjugativos y son incapaces de comenzar la conjugación, por lo tanto, pueden ser transferidos con la ayuda de elementos conjugativos que coexistan en la célula dadora. Los plásmidos no movilizables son aquellos que no son transferibles por conjugación, y solo se transmiten por transformación o transducción (Smillie et al., 2010).

La conjugación ocurre cuando el plásmido porta dos módulos de genes: 1) genes de movilidad (MOB), los cuales permiten el procesamiento del ADN conjugativo y 2) genes del complejo de formación del sistema de acoplamiento asociado a membrana (MPF), el cual es una forma del T4SS y provee el canal de acoplamiento. Un plásmido que codifique para MPF es denominado conjugativo o autotransferible, contrariamente, un plásmido que necesite dicha función sea aportada por otro elemento se denomina movilizable (Bennett, 2008). El elemento común tanto a los plásmidos conjugativos como movilizables, es la relaxasa (Figura 23), dicha proteína cataliza los primeros y los últimos pasos de la conjugación. La relaxasa es la proteína que reconoce y corta la secuencia de ADN dentro del *oriT*, y es la responsables de la ligación del ADN en la célula receptora para regenerar el plásmido (Smillie et al., 2010).

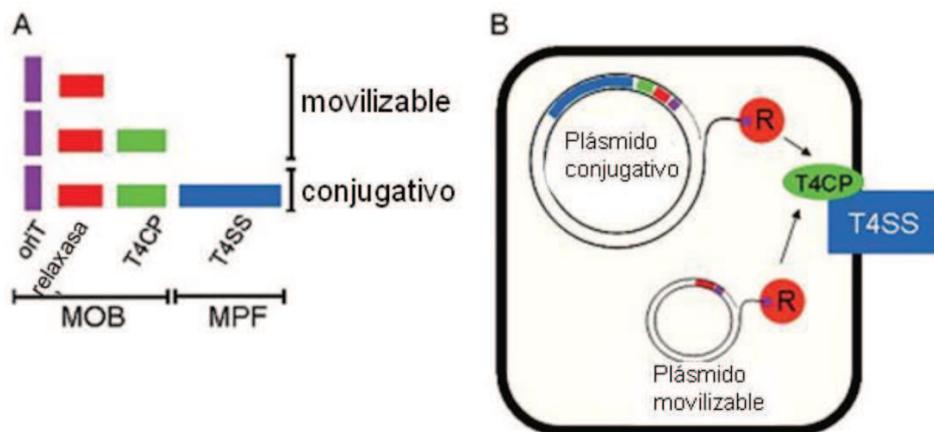


Figura 23: Plásmidos conjugativos y movilizables. Elementos presentes en cada tipo de plásmido. A) Los plásmidos conjugativos codifican para los 4 componentes del aparato conjugativo: un origen de transferencia (*oriT*, color violeta), una relaxasa (R, color rojo), una proteína de acoplamiento tipo IV (T4CP, color verde), y un sistema de secreción tipo IV (T4SS, color azul); el plásmido movilizable, contiene el módulo MOB con o sin T4CP y necesita que otro plásmido (plásmido *helper*) le aporte el módulo MPF para ser transmisible. B) Esquema de algunas interacciones esenciales en la conjugación. La conjugación comienza cuando la relaxasa corta una secuencia específica en la secuencia del *oriT* (Figura modificada de Smillie et al. (2010)).

En general, los plásmidos de resistencia movilizables tienden a ser relativamente pequeños, a menudo de menos de 10 kb de tamaño, codificando solo un

puñado de genes, incluidos los genes de resistencia, mientras que los plásmidos conjugativos tienden a ser algo más grandes, 30 kb o más (los plásmidos de resistencia de 100 kb o más no son inusuales), lo que refleja la cantidad considerable de ADN (20-30 kb) necesaria para codificar las funciones de conjugación que permiten el acoplamiento de célula a célula, particularmente entre bacterias gram negativas (Bennett, 2008).

2.2.3 Grupos de incompatibilidad

La presencia de más de un plásmido en una misma célula es un hecho frecuente en el mundo bacteriano (Carattoli et al., 2005). Los plásmidos que comparten el mismo replicón no pueden propagarse de manera estable en la misma línea celular, por lo que se consideran incompatibles, mientras que plásmidos con diferentes replicones son compatibles. Este fenómeno se conoce como incompatibilidad de plásmidos: la incompatibilidad es una manifestación de la relación de las secuencias que controlan la replicación, y se ha utilizado para clasificar plásmidos en grupos homogéneos (grupos de incompatibilidad, Inc) (Carattoli, 2013).

Datta y Hedges (1971) propusieron un esquema de clasificación basado en la incompatibilidad de los plásmidos observada durante la conjugación.

Los primeros grupos de incompatibilidad definidos fueron: IncI, IncN, IncF, e IncP. Actualmente, 28 grupos de incompatibilidad son reconocidos en *Enterobacterales* por la Sección de Plásmidos de la *National Collection of Type Culture* (Londres, Reino Unido), incluyendo seis variantes de IncF (FII a VII) y tres de IncI (I1, Iy, I2) (Rozwandowicz et al., 2018). Los plásmidos IncFII, IncA/C, IncL/M, IncN e IncI1 que llevan genes de BLEE y genes AmpC adquiridos se consideran actualmente “plásmidos de resistencia epidémica” y se detectan en todo el mundo en *Enterobacterales* de diferentes orígenes y fuentes (Carattoli, 2011). Se ha observado que los plásmidos IncA/C presentan dos linajes los cuales han sido designados como A/C₁ (IncA) y A/C₂ (IncC) (Harmer & Hall, 2015; Qi et al., 2021).

La clasificación en un grupo de incompatibilidad siempre se basa en la secuencia de aminoácidos de la proteína de iniciación de la replicación (Rep) (tipificación del replicón). La clasificación basada en la tipificación del replicón también es útil para agrupar los plásmidos en grupos de incompatibilidad no identificados (Shintani et al., 2015). Este método funciona como una herramienta importante para rastrear la difusión de plásmidos que confieren resistencia a antimicrobianos, y también es útil para seguir la evolución y propagación de plásmidos emergentes.

El reconocimiento de plásmidos exitosos es un primer paso fundamental para diseñar estrategias de intervención que prevengan su propagación. La capacidad de reconocer y categorizar plásmidos en grupos homogéneos sobre la base de su relación filogenética puede ser útil para analizar su distribución en la naturaleza, la relación con la célula huésped y descubrir su origen evolutivo (Carattoli, 2011).

Desde que se dispone de la tipificación molecular de plásmidos, se ha estudiado un número creciente de plásmidos en colecciones de bacterias obtenidas de fuentes humanas, animales y ambientales. Hasta la fecha, se han asignado miles de plásmidos a sus respectivos grupos de incompatibilidad que determinan el contenido de plásmidos en cepas de *Enterobacterales* clínicamente relevantes, por ejemplo las implicadas en brotes nosocomiales o las implicadas en la transmisión de resistencias entre animales y seres humanos (Carattoli, 2009). Junto con otras características específicas de los aislamientos bacterianos (es decir, el gen de resistencia que porta, el secuenciotipo, el grupo filogenético, el serotipo, etc.), la tipificación del replicón se utiliza actualmente como un marcador adicional para el análisis comparativo de cepas no relacionadas y relacionadas durante las investigaciones epidemiológicas (Carattoli, 2011).

2.2.4 Sistemas de adicción

Como se mencionó previamente, muchos plásmidos presentan sistemas basados en factores toxina-antitoxina (TA) que producen una presión selectiva matando a las células que no heredan el plásmido durante la división celular. Esta característica es conocida como sistemas de adicción y promueve el mantenimiento de un determinado plásmido en una población bacteriana.

La presencia del plásmido portador de sistemas de adicción asegura una producción continua de la antitoxina, quedando la toxina inhibida. Sin embargo, la pérdida de este plásmido implica la pérdida de la capacidad de sintetizar nueva antitoxina, con lo que la toxina, que es bioquímicamente más estable, queda libre para atacar su diana celular. Esto provoca la muerte de las bacterias libres del plásmido en el que está codificado el sistema TA (Carattoli, 2013).

El gen que codifica la toxina expresa una proteína con mayor vida media, en comparación con la estabilidad de la antitoxina. La antitoxina puede ser una proteína lábil o una especie de ARN antisentido no traducida (Leplae et al., 2011). La antitoxina es más inestable que la toxina, por lo que se necesita una producción constante de la misma para mantener inhibida la actividad de la toxina. Esta cualidad es la que permite actuar a los sistemas TA como módulos de estabilidad y/o adicción.

En base a la naturaleza de la antitoxina y su mecanismo de acción, los sistemas de adicción son divididos en 3 clases: I, II y III. Las antitoxinas tipo I y III son pequeñas moléculas de ARN que inhiben la expresión de la toxina (tipo I) o su actividad (tipo III) (Blower et al., 2011; Fozo et al., 2008; Leplae et al., 2011). Los sistemas de tipo II son los más estudiados y constan de antitoxinas proteicas que inactivan a la toxina por formación de complejos proteína-proteína (Gerdes et al., 2005).

Los sistemas toxina-antitoxina de tipo II presentan una organización genética bastante conservada y comprenden dos genes organizados en un operón, con una pequeña región intergénica que los separa. Ambos genes codifican para proteínas de tamaño pequeño, entre 31-204 aminoácidos para las antitoxinas y de 41-206 aminoácidos para toxinas (Pandey & Gerdes, 2005). El número de sistemas de tipo II ha crecido en los últimos años. En *E. coli* se han caracterizado 12 familias de TA (Fraikin et al., 2020), las cuales presentan similitud de aminoácidos en las toxinas que a su vez se asocian con una familia específica de antitoxina (Leplae et al., 2011; Pandey & Gerdes, 2005).

La antitoxina cumple una función de represor “débil” incapaz de impedir completamente la transcripción del operón. En las antitoxinas de naturaleza proteica, el dominio amino-terminal interactúa débilmente con el ADN y la región carboxi-terminal es necesaria para la interacción e inhibición de la toxina. Esta interacción TA permite la formación de un complejo represor completamente funcional, reduciéndose así la transcripción de ambos genes. Este efecto permite mantener unos niveles de toxina en la célula lo suficientemente bajos como para no interferir en el crecimiento normal de ésta, pero suficientemente altos como para responder rápidamente ante situaciones en el que el sistema debe activarse. De este modo, los sistemas de adicción contribuyen a un aparente nivel de estabilización del plásmido en la población. A su vez, se ha descrito que los plásmidos portadores del sistema TA son capaces de desplazar plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad que carezcan de estos sistemas (Cooper & Heinemann, 2000).

2.2.5 Relaxasas

La conjugación es el principal mecanismo para el intercambio genético en bacterias y un factor importante de la evolución bacteriana. Implica la escisión del ADN plasmídico a transferir en un sitio llamado *oriT* por una proteína denominada relaxasa. Como resultado de la reacción, la relaxasa se une covalentemente al *oriT* del ADN. El

complejo de nucleoproteínas resultante se transporta a la célula receptora mediante el mecanismo de exportación de proteínas T4SS.

Las relaxasas son proteínas grandes y normalmente contienen dos o más dominios proteicos. El dominio de la relaxasa propiamente dicho se encuentra siempre en el extremo N de la proteína. En el extremo C-terminal, casi siempre se encuentra una helicasa de ADN, una primasa de ADN u otro dominio de función desconocida (Garcillan-Barcia et al., 2009).

Las relaxasas se clasifican de acuerdo a su secuencia aminoacídica en 6 familias de proteínas denominadas MOB: MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_P y MOB_V (Figura 24) (Alvarado et al., 2012). Las familias MOB_F y MOB_H están bien resueltas en términos filogenéticos. La familia MOB_C es cuantitativamente más pequeña, pero ha crecido significativamente en los últimos años. La superfamilia MOB_P se amplió enormemente (ahora incluye a la familia MOB_{HEN}). Por su parte, la familia MOB_Q se superpone parcialmente a MOB_P. Finalmente, la superfamilia MOB_V es muy diversa y se superpone parcialmente a MOB_P, sin embargo es la menos estudiada debido a su relativa escasez de secuencias (Garcillan-Barcia et al., 2009).

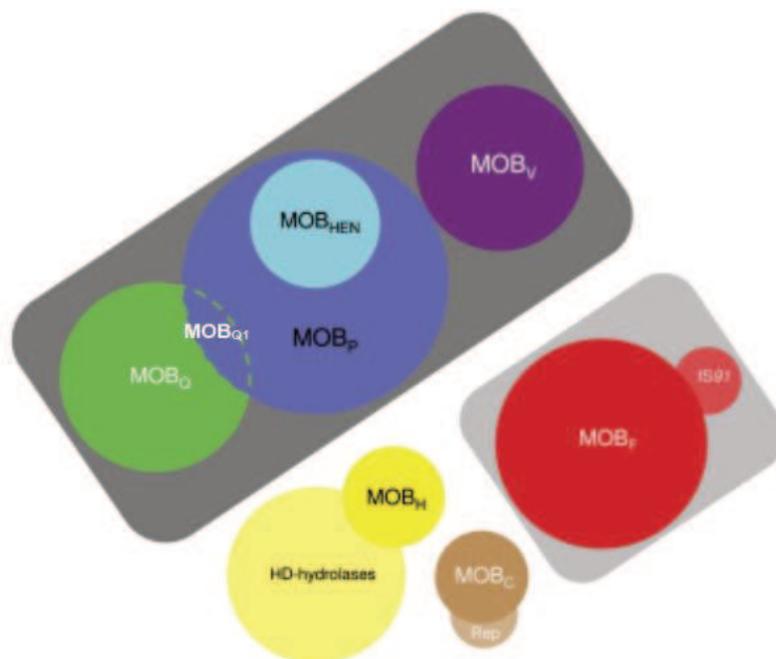


Figura 24: Esquema de las relaciones entre las principales familias de proteínas relaxasas. Un primer grupo de relaxasas (mostrado sobre un fondo gris oscuro) contiene tirosina en su sitio activo (MOB_V, MOB_P, MOB_{HEN} y MOB_Q). Un segundo grupo de relaxasa (gris claro) contiene relaxasas con dos tirosinas en su sitio activo (MOB_F). Para los grupos restantes (fondo blanco) no se conoce lo suficiente sobre la bioquímica de las respectivas relaxasas (MOB_H y MOB_C). Las áreas de los círculos son proporcionales al número de relaxasas descritas. El área MOB_P incluye MOB_P, MOB_{HEN} y MOB_{Q1} (clado de MOB_Q) (Figura modificada de Garcillan-Barcia et al. (2009)).

La familia de relaxasas MOB_F se compone de proteínas grandes que constan de dos dominios: un dominio de relaxasa y un dominio de helicasa. El dominio de helicasa es característico de las relaxasas MOB_F y probablemente constituye una señal de adaptación importante de estos sistemas conjugativos. Esta familia se divide en diferentes clados bien resueltos. El clado MOB_{F1} es el más numeroso e incluye plásmidos de los grupos de incompatibilidad clásicos IncF, IncN, e IncW de *Gammaproteobacteria* (Figura 25). A su vez, el clado MOB_{F1} se divide en 3 subclados diferenciados (MOB_{F11} , MOB_{F12} y MOB_{F13}) (Garcillan-Barcia et al., 2009).

MOB_H representa una nueva y bien resuelta familia de relaxasas. No tiene relación con ninguna otra familia de relaxasas. Se compone de proteínas asociadas a grandes plásmidos conjugativos de los grupos de incompatibilidad clásicos (IncH e IncA/C). La familia MOB_H se divide en dos clados asociados a plásmidos de *Gammaproteobacteria* (MOB_{H1} y MOB_{H2}) (Figura 25). A su vez, MOB_{H1} se divide en 2 subclados, MOB_{H11} asociado a plásmidos IncHI y MOB_{H12} que se subdivide en sub-subclados (Garcillan-Barcia et al., 2009).

La familia MOB_C es otra de las familias de relaxasas bien discriminadas filogenéticamente hablando. Ha sido encontrada en plásmidos asociados a *Gammaproteobacteria*, *Firmicutes* y *Tenericutes*. Presenta 3 clados bien definidos (MOB_{C1} , MOB_{C2} y MOB_{C3}) (Garcillan-Barcia et al., 2009).

La familia MOB_Q presenta una superposición filogenética con parte de la familia MOB_P , aunque presenta varios clados bien resueltos. El clado MOB_{Q1} es el único que está relacionado con MOB_P y ha sido asociado a *Gammaproteobacteria*. El resto de las relaxasas MOB_Q presentan mayor evolución por lo que se encuentran más distanciadas filogenéticamente de MOB_P (Alvarado et al., 2012).

MOB_P representa la mayor familia de relaxasas. Es una familia en evolución activa, con varios clados distinguibles (MOB_{P1} , MOB_{P2} , MOB_{P3} , MOB_{P4} , MOB_{P5} , MOB_{P6} y MOB_{P7}). MOB_{P1} se asocia a plásmidos con los grupos de incompatibilidad IncP e IncI en *Enterobacteriales* (Figura 25) y se distribuye en todas las divisiones de *Proteobacteria*. Los clados MOB_{P3} y MOB_{P4} se encuentran en plásmidos IncX (Garcillan-Barcia et al., 2009).

MOB_V es una familia de relaxasas que está ancestralmente relacionada a MOB_P . Desafortunadamente, se encuentra poca información sobre la caracterización de las relaxasas MOB_V (Garcillan-Barcia et al., 2009).

Se ha demostrado que las relaxasas son una herramienta filogenética conveniente para la clasificación de plásmidos (Francia et al., 2004).

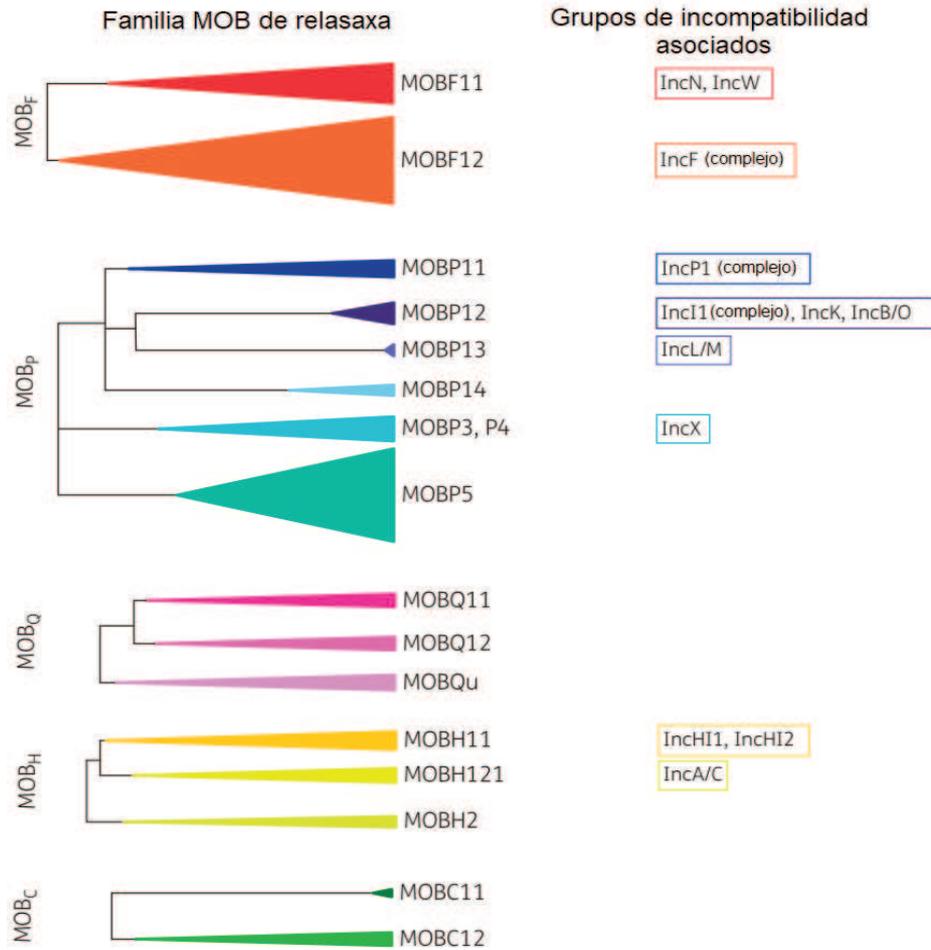


Figura 25: Familias de relaxasas en plásmidos de *Gammaproteobacteria* y su asociación con grupos de incompatibilidad de plásmidos de *Enterobacterales* (Figura modificada de Rozwandowicz et al. (2018)).

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

- Determinar la prevalencia de aislamientos de *Enterobacterales* con fenotipo de resistencia disociada a CTG.
- Caracterizar los mecanismos de resistencia involucrados en los aislamientos con resistencia disociada entre las CTG.
- Cuantificar la cantidad de plásmidos presentes en los aislamientos estudiados y estimar su tamaño.
- Clasificar a los plásmidos encontrados en conjugativos o movilizables, y de acuerdo a su grupo de incompatibilidad y relaxasa tipo MOB que codifiquen.
- Determinar la presencia de los distintos sistemas de adición en plásmidos de resistencia estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Detección de los aislamientos que presentaron fenotipo disociado a CTG

Los aislamientos de *Enterobacterales* con fenotipo de resistencia disociado se detectaron a partir del análisis de los perfiles de sensibilidad obtenidos para las CTG. Los métodos para determinar estos perfiles se describieron en el capítulo precedente.

Para categorizar a los aislamientos como sensibles o resistentes frente a una determinada CTG se utilizaron los puntos de corte establecidos por el CLSI (2010) y que en la actualidad se mantienen vigentes. Los puntos de corte utilizados para CTX y CAZ se muestran en la tabla 10.

Tabla 10: Puntos de corte establecidos por el CLSI para CTG.

	Diámetro del halo (Antibiograma)		CIM	
	CTX	CAZ	CTX	CAZ
Sensibilidad	≥ 26 mm	≥ 21 mm	≤ 1 µg/mL	≤ 4 µg/mL
Resistencia	≤ 22 mm	≤ 17 mm	≥ 4 µg/mL	≥ 16 µg/mL

Los fenotipos de resistencia disociada a CTG buscados fueron CTX^R y CAZ^S o CTX^S y CAZ^R.

2.2 Detección de los mecanismos responsables del fenotipo disociado

Los mecanismos se detectaron fenotípicamente siguiendo los protocolos descritos en el capítulo 1 de este trabajo. Los aislamientos resistentes a alguna de las CTG ensayadas (CTX o CAZ), que presentaron resistencia o sensibilidad disminuida a FEP y sinergia (efecto “huevo”) entre CLV con alguna CTG se categorizaron como sospechosos de BLEE. Todos estos aislamientos fueron sometidos a la prueba confirmatoria de BLEE propuesta por el CLSI (2020).

Por otro lado, la resistencia a alguna de las CTG ensayadas (CTX o CAZ) con sensibilidad a FEP, resistencia a FOX son indicadores de la presencia de β-lactamasas tipo AmpC. Para verificar la presencia de este mecanismo se evalúa la sinergia entre CTG y APB disponiendo los discos a una distancia de 20 a 15 mm y, a su vez, se realiza la prueba confirmatoria de BLEE que debe ser negativa.

2.3 Caracterización molecular de BLEE y AmpC responsables del fenotipo disociado

La caracterización molecular se realizó mediante PCR de acuerdo a los protocolos descritos en el capítulo 1.

Para los aislamientos que mostraron fenotipo de resistencia disociada a CTG en el estudio prospectivo de *Enterobacterales* y el total de los aislamientos de *S. enterica* resistentes a CTG se realizó la secuenciación del gen de la β -lactamasa presuntivamente responsable de producir dicho fenotipo.

2.3.1 Secuenciación

Se secuenciaron genes de BLEE tipo CTX-M de los grupos 1, 2 y 9; y genes CMY; para tal fin, se realizaron PCR de acuerdo con los protocolos detallados en el capítulo precedente. Los productos de amplificación obtenidos se purificaron utilizando el kit comercial *AccuPrep purification kit* (Bionner Corporation, Corea del Sur). 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 del Sur).

2.3.2 Análisis de secuencias y determinación de β -lactamasas

El análisis de las secuencias crudas obtenidas en la etapa previa se llevó a cabo mediante el uso de diferentes programas informáticos *online* y *offline*, tales como, Vector NTI advance 11 (Invitrogen, EE.UU.), Chromas Lite 2.1 (South Brisbane, Australia) y BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

El software Vector NTI advance 11 se utilizó para realizar el ensamblado (*ContigExpress*) de las dos cadenas secuenciadas y el posterior alineamiento (*Align*) con las secuencias de cada β -lactamasa depositadas en la base de datos *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Mediante el uso del programa Chromas Lite 2.1 se visualizó el cromatograma de cada secuencia evidenciando posible errores de interpretación de los nucleótidos que la componen.

Usando BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se compararon y alinearon las secuencias obtenidas con las que se encuentran en la base de datos de nucleótidos (*nucleotide blast*) para diferentes β -lactamasas.

2.4 Transferencia de genes

Se realizaron ensayos de conjugación bacteriana y de transformación por electroporación (Sambrook et al., 1989) para transferir los plásmidos portadores de los genes de las β -lactamasas presumiblemente responsables de causar los fenotipos de resistencia disociada a CTG. En el proceso de conjugación y en el de electroporación, se utilizaron como cepas receptoras *E. coli* Top10F-, *E. coli* HB101 y *E. coli* J53-B2.

2.4.1 Conjugación

Se incubaron cultivos puros de los aislamientos dadores y de las cepas receptoras por separado en 5 mL de caldo CTS (Britania, Argentina) a 37 °C sin agitación durante 18 horas. El cultivo de cada aislamiento dador se diluyó 1/20 en CTS y se incubó nuevamente durante 3 horas con agitación, para obtener un cultivo en fase logarítmica de crecimiento. En una placa conteniendo ATS (Britania, Argentina) se colocó una membrana de acetato de celulosa (Sartorius, Alemania) estéril (tamaño de poro de 0,2-0,45 µm). Sobre la membrana se adicionaron 50 µL de células dadoras y 50 µL de células receptoras, se incubó la placa a 37 °C durante 18-24 horas. Posteriormente, las células fueron resuspendidas, transfiriendo las membranas a tubos plásticos de 15 mL los cuales contenían 3 mL de solución fisiológica (SF) estéril. Las suspensiones bacterianas fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó tanto el sobrenadante como la membrana, y el *pellet* se sembró por extensión en placas de ATS suplementado con el sistema de selección adecuado (Tabla 11); lo mismo se realizó para los controles en medios de selección adecuados para las correspondientes células dadoras y las receptoras, pero sin presión de selección. Se incubó nuevamente a 37 °C durante 18-24 horas. Los pasos utilizados para llevar a cabo los ensayos de conjugación se resumen esquemáticamente en la figura 26.

Tabla 11: Combinaciones de antibióticos usadas en el diseño de los sistemas de selección, de acuerdo a cada cepa receptora empleada en los ensayos de conjugación.

<i>E. coli</i> TOP10 y <i>E. coli</i> HB101			<i>E. coli</i> J53-B2			
Concentración de ATB (µg/mL)			Concentración de ATB (µg/mL)			
AMP	CTX	STR*	AMP	CTX	AZIDA	RIF**
-	0,25	250	-	0,25	200	200
-	0,5	250	-	0,5	200	200
-	1	250	-	1	200	200
50	-	250	50	-	200	200
100	-	250	100	-	200	200
150	-	250	150	-	200	200

*Estreptomina

**Rifampicina

Para verificar el éxito en los ensayos de conjugación se realizó la identificación bacteriana de los transconjugantes obtenidos y se evaluó la presencia de genes

codificantes de β -lactamasas mediante las reacciones de PCR descritas en el capítulo anterior.

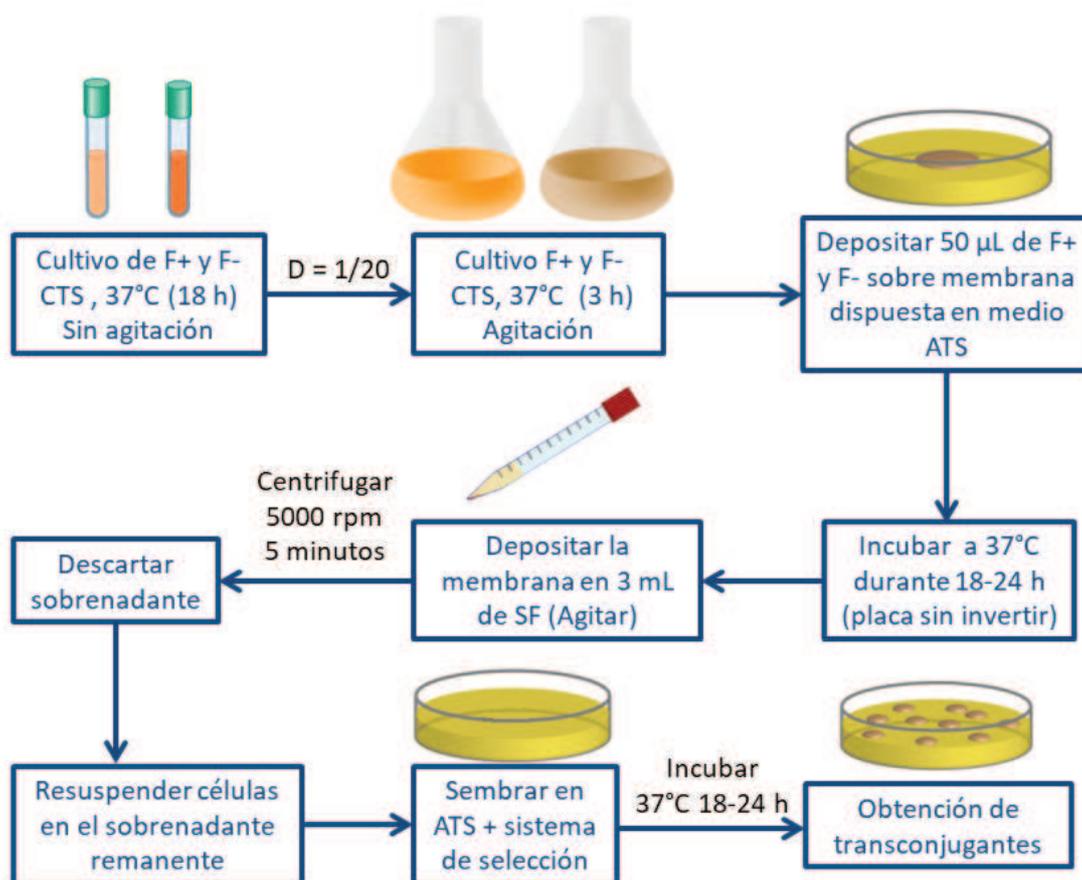


Figura 26: Esquema de pasos utilizados para la realización de los ensayos de conjugación en medio sólido.

2.4.2 Transformación por electroporación

Los intentos de transformación se efectuaron sobre aquellos aislamientos para los que no fue posible obtener transconjugantes en los ensayos de conjugación. En la figura 27 se muestra un resumen esquemático de los pasos utilizados para realizar la transformación por electroporación.

2.4.2.1 Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción y purificación del ADN plasmídico se usó la metodología de extracción propuesta por Kado y Liu (1981).

2.4.2.2 Desalado de plásmidos

Los plásmidos fueron desalados usando conos de agarosa que se prepararon mezclando 0,9 g de glucosa y 0,5 g de agarosa en 50 mL de agua. Se disolvió por

calentamiento, hasta obtener una solución líquida y transparente. La solución se mantuvo a 50 °C en baño termostatzado hasta su uso. Posteriormente, en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL se colocaron 800 µL de la solución de agarosa y se colocó dentro de este un tubo cónico de 0,5 mL, manteniéndolo allí hasta que la agarosa gelificó. Se retiró el tubo de 0,5 mL por rotación, obteniéndose de esta forma una cavidad cóncava dentro de la agarosa. En esta cavidad se agregó la cantidad de plásmido que se deseó desalar, dejando los tubos en hielo por 60 minutos. Finalmente, se transfirió la solución con el plásmido a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL adecuadamente rotulado, y se conservó a 4 °C hasta el momento de su uso.

2.4.2.3 Obtención de células electrocompetentes

La electroporación se realizó sobre células receptoras electrocompetentes obtenidas partiendo de un cultivo en placa incubado a 37 °C por 18-24 h. Se tomó una colonia y se inoculó un volumen de 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) (ver en la sección Anexos la composición del medio de cultivo), y se incubó durante 24 h a 37 °C. Luego, se tomaron 3 mL de este cultivo y se diluyeron en 300 mL de LB (dilución 1/100). Se incubó en agitación hasta obtener una lectura de densidad óptica de 0,7 medida a una longitud de onda de 550 nm. El valor de densidad óptica se ajustó mediante diluciones con medio de cultivo estéril. El volumen final se distribuyó en dos frascos para ultracentrífuga y se centrifugaron a 4 °C y 6500 rpm durante 5 minutos en Centrífuga Sorvall RC 6 Plus (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). El siguiente paso consistió en dos lavados sucesivos con agua *miliQ* fría y estéril, resuspendiendo entre cada lavado con micropipeta. Luego se realizó un lavado final con solución de glicerol al 10% v/v, fría y estéril, y se transfirió el volumen de la suspensión a tubos de microcentrífuga. Los mismos se centrifugaron, en las condiciones descritas anteriormente, resuspendiendo luego los *pellets* con la solución glicerinada remanente y transfiriendo las suspensiones resultantes de un tubo a otro, en forma sucesiva, para obtener todas las células en un único tubo. La masa de bacterias obtenida se resuspendió en 600 µL de glicerol al 10%, a partir del cual se tomaron alícuotas de 40 µL que se transfirieron a tubos de microcentrífuga estériles, para ser finalmente conservadas a -80 °C.

2.4.2.4 Electroporación

Las transformaciones se llevaron a cabo utilizando el electroporador *GenePulser* (Bio-Rad, EE.UU.). El protocolo de electroporación que se utilizó, consistió en descongelar tanto los plásmidos como las células electrocompetentes manteniéndolas en hielo. Se lavaron 3 veces las cubetas o celdas de electroporación

con agua *miliQ* estéril, luego con 1 mL de etanol de calidad analítica. Posteriormente se llenaron las cubetas con etanol de calidad analítica hasta su uso, para lo cual se descartó el etanol y se lavó una última vez con agua *miliQ*. Una vez listas las celdas, se depositaron las células electrocompetentes en las mismas y luego, 5 μ L de la solución desalada de plásmidos; entonces, se proporcionó el pulso eléctrico (1800 V, 50 μ F y 100 Ω). Inmediatamente después de recibir el pulso eléctrico, las células fueron resuspendidas con 500 μ L de caldo 2XYT (ver en la sección Anexos la composición del medio de cultivo), que fueron trasvasados a un tubo de ensayo estéril, se lavó nuevamente la cubeta con 500 μ L con el mismo caldo y se trasvasó este volumen al tubo donde se había depositado el caldo con el primer lavado. Luego, se incubó a 37 °C por 2 h. Pasado este tiempo, se centrifugó a 5000 rpm por 7 minutos, y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el *pellet* en el sobrenadante remanente y se sembraron 100 μ L de esta suspensión en las placas con medio de cultivo ATS suplementado con el sistema de selección. Paralelamente una alícuota de la suspensión bacteriana se sembró en medio ATS libre de antibióticos como control de viabilidad de las células electrocompetentes. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18-24 h.

Los sistemas de selección utilizados fueron los mismos que los usados en los ensayos de conjugación. A su vez, se probaron sistemas de selección compuestos solamente por AMP o CTX.

Se verificó el éxito de la transformación a través de la detección en las células transformantes de los genes codificantes de β -lactamasas mediante las reacciones de PCR descritas en el capítulo anterior.

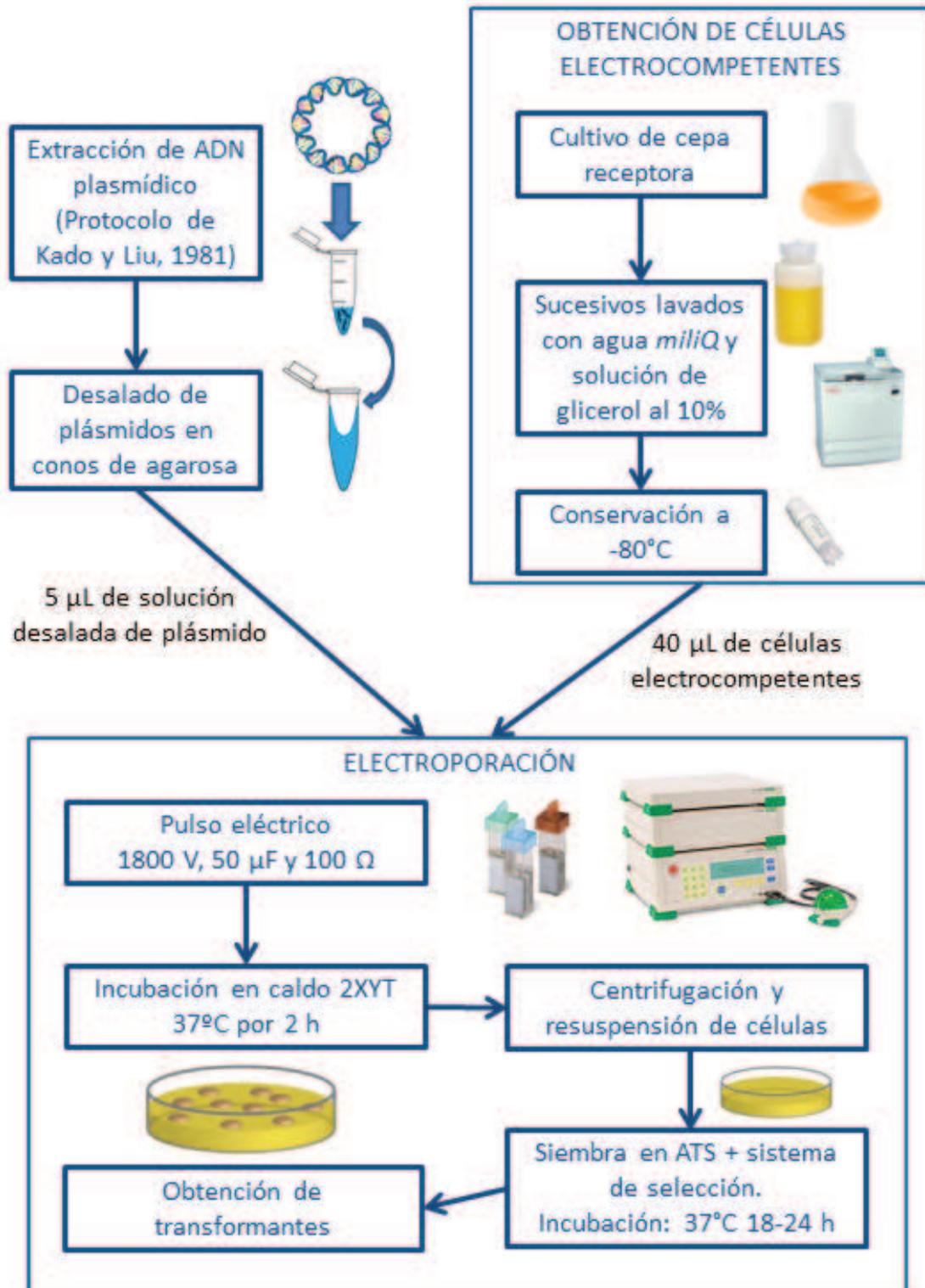


Figura 27: Esquema de pasos utilizados para la realización de los ensayos de transformación por electroporación.

2.5 Perfiles de sensibilidad de transconjugantes

Los perfiles de sensibilidad de los transconjugantes obtenidos se determinaron mediante el equipo automatizado Vitek (bioMérieux, Francia) y ensayos cualitativos

por el método de difusión en agar siguiendo las recomendaciones y lineamientos del CLSI (2020) y utilizando agar Mueller Hinton (Britania, Argentina).

Los antibióticos ensayados fueron CTX, CAZ, FEP, IMI, GEN, CIP, TMS y NIT.

Se prestó especial atención a los perfiles obtenidos para β -lactámicos principalmente para CTG.

2.6 Perfil plasmídico

Se determinó el número y el tamaño de plásmidos por Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) con digestión enzimática usando S1-nucleasa.

2.6.1 Preparación de *plugs* de agarosa

En primera instancia se realizó la preparación de los *plugs* de agarosa siguiendo la metodología de Miranda et al. (1996). 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. Estos fueron preparados a partir de un cultivo de 18 a 24 h en placa con medio ATS, se inoculó una colonia aislada en 5 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Britania, Argentina) y se incubó de 18 a 24 h a 37 °C. Se tomó 1 mL de cultivo y se lo centrifugó en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL a 12.000 rpm en microcentrífuga *MiniSpin*[®] (Eppendorf, Alemania) por 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante con pipeta automática y se resuspendió el *pellet* bacteriano con 1 mL de *buffer* PIV (ver en la sección Anexos la composición del *buffer* PIV). Se centrifugó nuevamente y se eliminó todo el sobrenadante. Este *pellet* bacteriano se resuspendió con 200 μ L de *buffer* PIV (se consideró como volumen inicial 210 μ L). De esta suspensión se tomaron 5 μ L y se depositaron en una cubeta para espectrofotómetro conteniendo 1 mL de *buffer* PIV (dilución 1:200). La cubeta se cubrió con parafilm[®] y se homogeneizó por inversión.

Una vez homogeneizada la suspensión, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 620 nm (DO_{620}), empleando *buffer* PIV como blanco. La DO_{620} estuvo siempre entre 0,05 – 0,15. Se calculó el volumen de *buffer* PIV necesario a agregar a la suspensión bacteriana (Tabla 12), para alcanzar la densidad celular adecuada, según la siguiente fórmula:

$$\text{Vol. de } \textit{buffer} \text{ PIV a agregar en } (\mu\text{L}) = (DO_{\text{medido}} \times 40 \times 210) - 210$$

Tabla 12: Dilución con *buffer* PIV según DO₆₂₀ obtenida.

DO _{medida}	Vol. de <i>buffer</i> 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	-

DO: Densidad óptica
 PIV: *Buffer* utilizado para PFGE

Una vez ajustada la concentración de células en la suspensión bacteriana se limpiaron los moldes para preparación de los *plugs* (Bio-Rad, EE.UU.) con alcohol al 70%, y se transfirieron 150 µL de la suspensión bacteriana a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, para ser incubado durante 10 minutos a 50 °C. A la suspensión bacteriana se agregaron 150 mL de agarosa de bajo punto de fusión (Genbiotech, Argentina) al 1,6% fundida y atemperada a 50 °C y se mezcló rápidamente en vortex. La mezcla generada se depositó en los moldes usando pipeta automática y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Una vez solidificada la agarosa, los moldes se refrigeraron a 4 °C durante 45 minutos y posteriormente se removieron cuidadosamente cada *plug* con ayuda de un ansa descartable estéril, se colocaron en tubos de 15 mL con 1 mL de *buffer* de lisis y se incubaron *overnight* a 37 °C. Luego de la incubación, se reemplazó el *buffer* de lisis por *buffer* ES-P y se incubó nuevamente durante 24 h a 50 °C. Finalizada la incubación, los *plugs* se traspasaron a tubos de 50 mL con tapa a rosca y se lavaron durante 30 minutos, usando agitación orbital, con *buffer* TE 1X con el objetivo de eliminar la proteinasa K. Estos lavados se repitieron al menos 5 veces. Finalizados los lavados, los *plugs* fueron cortados transversalmente a la mitad y se conservaron en *buffer* TE 1X a 4 °C hasta el momento de su uso (de 1 a 120 días después). En la sección Anexos se encuentran las composiciones de los *buffers* de lisis, ES-P y TE.

2.6.2 Digestión enzimática con S1 nucleasa

El día de la electroforesis, los *plugs* se equilibraron con 200 µL de *buffer* para S1-nucleasa incubando 30 minutos a temperatura ambiente. A esta mezcla se añadió 0,2 µL (10 U/µL) de S1-nucleasa (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y se incubó

durante 3 h a 37 °C (Barton et al., 1995). En estas condiciones, la S1-nucleasa convierte plásmidos superenrollados en moléculas completamente lineales que pueden migrar como bandas discretas, mientras que el ADN genómico no es digerido.

2.6.1 Electroforesis en gel de campo pulsado

Posteriormente, los *plugs* se colocan dentro del gel de corrida hecho con agarosa para PFGE (Bio-Rad, EE.UU.) al 1,2% - 1,5% en *buffer* TBE 0,5X (Inbio Highway, Argentina), y se realiza la electroforesis del gel durante 20 horas a 6 voltios/cm a 14 °C; con un pulso inicial de 5 segundos y uno final de 60 segundos, utilizando el equipo CHEF-DR11 (Bio-Rad, EE.UU.). Como marcador de peso molecular se utilizó Lambda Ladder PFGE Marker (Promega, EE.UU.).

El gel se tiñó con bromuro de etidio 0,5 µg/mL y se visualizó en transiluminador UV.

2.7 Tipificación molecular de plásmidos

2.7.1 Tipificación de replicones (grupos de incompatibilidad)

La tipificación molecular de los plásmidos portadores de los diferentes determinantes de resistencia analizados en este capítulo, se llevó a cabo por medio de la identificación del grupo de incompatibilidad de los mismos, a partir de la técnica *PCR-Based Replicon Typing method* (PBRT) (Carattoli et al., 2005).

Se realizó la identificación de los principales grupos de incompatibilidad circulantes en *Enterobacteriales*: **IncFIA**, **IncFIB**, **IncFIC**, **IncHI2**, **IncI1**, **IncL/M**, **IncN**, **IncP**, **IncW**, **IncT**, **IncA/C**, **IncK**, **IncB/O**, **IncX**, **IncY**, **IncF**, **IncFIIA**, empleando cinco ensayos de PCR multiplex y tres PCR simples.

Los cebadores utilizados para la detección de cada grupo de incompatibilidad se detallan en la tabla 13.

En todos los casos se utilizó como molde de reacción al ADN obtenido mediante lisis o ADN plasmídico, tanto de aislamientos como de transconjugantes.

CAPÍTULO 2 - MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 13: Cebadores empleados para la determinación de los grupos de incompatibilidad.

	Cebador	Secuencia 5'→3'	Sitio blanco de amplificación	Tamaño del amplicón (pb)	Grupo Inc/rep
Multiplex 1	HI1 Fw	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	parA-parB	471	HI1
	HI1 Rv	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			
	HI2 Fw	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC	Iterons	644	HI2
	HI2 Rv	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
	I1 Fw	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	RNAI	139	I1
	I1 Rv	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT			
Multiplex 2	X Fw	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	ori γ	376	X
	X Rv	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC			
	L/M Fw	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	repA, B, C	785	L/M
	L/M Rv	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			
	N Fw	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	repA	559	N
	N Rv	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
Multiplex 3	FIA Fw	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	Iterons	462	FIA
	FIA Rv	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			
	FIB Fw	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	repA	702	FIB
	FIB Rv	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
	W Fw	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG	repA	242	W
	W Rv	GGTGCGCGGCATAGAACCGT			
Multiplex 4	Y Fw	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	repA	765	Y
	Y Rv	GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT			
	P Fw	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	Iterons	534	P
	P Rv	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			
	FIC Fw	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	repA2	262	FIC
	FIC Rv	TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT			
Multiplex 5	A/C Fw	GAGAACC AAAGACAAAGACCTGGA	repA	465	A/C
	A/C Rv	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			
	T Fw	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	repA	750	T
	T Rv	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			
	FII _s Fw	CTGTGTAAGCTGATGGC	repA	270	FIIA
	FII _s Rv	CTCTGCCACAACTTCAGC			
S	F _{repB} Fw	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	RNAI/repA	270	F
	F _{repB} Rv	GAAGATCAGTCACACCATCC			
S	K/B Fw	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	RNAI	160	K
	K Rv	TCTTTCACGAGCCCCGCAAA			
S	K/B Fw	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	RNAI	159	B/O
	B/O RV	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA			

S: PCR simples

A continuación se detallan las mezclas de reacción para las cinco reacciones multiplex, las tres reacciones simples y las condiciones de ciclado utilizadas.

Mezcla de reacción (1x) para reacciones multiplex con un volumen final de 25 μ L.

Reactivo (concentración)	Cantidad (μ L)
<i>Buffer</i> de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (10 mM)	1
Cebador 1a Fw (10 μ M)	1,5
Cebador 1b Rv (10 μ M)	1,5
Cebador 2a Fw (10 μ M)	1,5
Cebador 2b Rv (10 μ M)	1,5
Cebador 3a Fw (10 μ M)	1,5
Cebador 3b Rv (10 μ M)	1,5
<i>Taq</i> polimerasa (5U/ μ L)	0,2
H ₂ O <i>milliQ</i> estéril	8,3
ADN molde	2

Mezcla de reacción (1x) para reacciones simples con un volumen final de 25 μ L.

Reactivo (concentración)	Cantidad (μ L)
<i>Buffer</i> de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (10 mM)	1
Cebador a Fw (10 μ M)	1,5
Cebador b Rv (10 μ M)	1,5
<i>Taq</i> polimerasa (5U/ μ L)	0,2
H ₂ O <i>milliQ</i> estéril	14,3
ADN molde	2

Las condiciones de ciclado utilizadas para las reacciones fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, anillado a T_A durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 1 minuto.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

T_A: Se utilizó una temperatura de anillado de 60 °C para las 5 multiplex y 2 reacciones simple (Inc K y B/O). Para la reacción de Inc F se utilizó una temperatura de anillado a 52 °C.

Los productos de amplificación fueron resueltos a 6V/cm en geles de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (ver en la sección Anexos la composición del *buffer* TAE). Como colorante se utilizó GelRed (Biotium, EE.UU.) según las recomendaciones del fabricante y se utilizó el marcador de peso molecular Ladder 100 bp (Inbio Highway, Argentina). Los geles fueron visualizados con el transiluminador UV, Molecular Imager GelDoc XR Sistem, Life Science Research, Bio-Rad.

2.7.2 Caracterización de sistemas de adicción

Los sistemas de adicción (o sistemas toxina-antitoxina) se caracterizaron mediante PCR simples con cebadores específicos de acuerdo a la metodología propuesta por Mnif et al. (2010). Los cebadores utilizados para la amplificación y caracterización de los sistemas de adicción *pemKI*, *ccdAB*, *relBE*, *parDE*, *vagCD*, *hok-sok*, *pndAC* y *srnBC* se resumen en la tabla 14.

En todos los casos se utilizó como molde de reacción al ADN obtenido mediante lisis o ADN plasmídico, tanto de aislamientos como de transconjugantes.

Tabla 14: Cebadores usados para la detección de sistemas de adicción.

Cebador	Secuencia 5'→3'	Blanco de amplificación	Tamaño del amplicón (pb)	Sistema detectado
PemK-up	AACGAGAATGGCTGGATGC	<i>pemK</i>	232	<i>pemKI</i>
PemK-low	CCAACGACACCGCAAAGC			
CcdA-up	AGGAAGGGATGGCTGAGGT	<i>ccdA</i>	230	<i>ccdAB</i>
CcdB-low	GGTAAAGTTCACGGGAGAC			
RelE-up	AAAAACCCGATGGCGACAG	<i>relE</i>	370	<i>relBE</i>
RelE-low	TGATAGACCAGGCGAAAAC			
ParD-up	ACGGACCAGCAGCACCAG	<i>parD</i>	534	<i>parDE</i>
ParE-low	AGCCCTTGAGCCTGTCCG			
VagC-up	GGGACCTGGATTTTGATGG	<i>vagC</i>	210	<i>vagCD</i>
VagD-low	GAGCAGATGTTGGTGTCCG			
Hok-up	AGATAGCCCCGTAGTAAGTT	<i>hok</i>	203	<i>hok-sok</i>
Sok-low	GATTTTCGTGTCAGATAAGTG			
PndC-up	TCAATCAACCAGGGCTCT	<i>pndC</i>	140	<i>pndAC</i>
PndA-low	CCTCACCATCCAGACAAAA			
SrnB-up	ACTGATTGTAGCCTCTTCTTT	<i>srnB</i>	171	<i>srnBC</i>
SrnC-low	CACCACTGTATTTCCCCTGT			

A continuación se detalla la mezcla de reacción para las PCR simples y las condiciones de ciclado utilizadas.

Mezcla de reacción (1x) con un volumen final de 25 µL.

Reactivo (concentración)	Cantidad (µL)
Buffer de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
dNTPs (10 mM)	0,5
Cebador a Fw (10 µM)	1,5
Cebador b Rv (10 µM)	1,5
Taq polimerasa (5U/µL)	0,2
H ₂ O milliQ estéril	15,3
ADN molde	2

Las condiciones de ciclado utilizadas para las reacciones fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 3 minutos.
- 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto, anillado a T_A durante 1 minuto y extensión a 72 °C durante 35 segundos.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 7 minutos.

T_A : Se utilizó una temperatura de anillado de 54 °C para los sistemas *pemKI*, *ccdAB*, *hok-sok* y *srnBC*; 57 °C para *relBE*; 58 °C para *parDE*; 53 °C para *vagCD*; y 52 °C para *pndAC*.

Los productos de amplificación fueron resueltos a 6V/cm en geles de agarosa al 2 % en buffer TAE 1X. Como colorante se utilizó GelRed y se utilizó el marcador de peso molecular Ladder 100 bp. Los geles fueron visualizados con el transiluminador UV.

2.7.3 Tipificación de relaxasas (MOB)

Se realizó la caracterización plasmídica usando el método *Degenerate Primer MOB Typing* (DPMT) (Alvarado et al., 2012). La técnica consiste en reacciones de PCR simples que permiten caracterizar 19 subfamilias de relaxasas MOB. Los 19 pares de cebadores utilizados para la amplificación de las diferentes subfamilias de las relaxasas MOB_F (F11 y F12), MOB_P (P11, P12, P13, P14, P3, P4, P51, P52 y P53), MOB_Q (Q11, Q12 y Qu), MOB_H (H11, H121 y H2) y MOB_C (C11 y C12) se resumen en la tabla 15.

En todos los casos se utilizó como molde de reacción al ADN obtenido mediante lisis o ADN plasmídico, tanto de aislamientos como de transconjugantes.

A continuación se detalla la mezcla de reacción para las PCR simples y las condiciones de ciclado utilizadas.

Mezcla de reacción (1x) con un volumen final de 25 μ L.

Reactivo (concentración)	Cantidad (μL)
<i>Buffer</i> de reacción (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2
dNTPs (10 mM)	1
Cebador a Fw (10 μ M)	2,5
Cebador b Rv (10 μ M)	2,5
<i>Taq</i> polimerasa (5U/ μ L)	0,2
H ₂ O <i>milliQ</i> estéril	12,3
ADN molde	2

CAPÍTULO 2 - MATERIALES Y MÉTODOS

Las condiciones de ciclado utilizadas para las reacciones fueron las siguientes:

- Un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante 4 minutos.
- 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, anillado a T_A durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos.
- Un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

Las T_A utilizadas se describen en la tabla 15.

Tabla 15: Cebadores usados para la detección de las diferentes subfamilias de relaxasas.

Cebador	Secuencia 5'→3'	Subfamilia detectada	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de anillado en °C (T_A)
F11-f	GCAGCGTATTACTTCTCTGCTGCCGAYGAYTAYTA	MOB _{F11}	234	53
F11-r	ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC			
F12-f	AGCGACGGCAATTATTACACCGACAAGGAYAAAYTAYTA	MOB _{F12}	234	55
F12-r	ACTTTTGGGCGCGGARAABTGSAGRTC			
P11-f	CGTGCGAAGGGCGACAARACBTAYCA	MOB _{P11}	180	60
P11-r	AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTTCNGTRTC			
P12-f	GCACACTATGCAAAAGATGATACTGAYCCYGT	MOB _{P12}	189	53
P12-r	AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTTCNGTRTC			
P131-f	AACCCACGCTGCAARGAYCCVGT	MOB _{P13}	180	59
P131-r	AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTTCNGTRTC			
P14-f	CGCAGCAAGGACACCATCAAYCAYTAYRT	MOB _{P14}	174	50
P14-r	AGCGATGTGGATGTGAAGGTTTTCNGTRTC			
P3-f	CCGTGAGCCAAATCACACAGAATATKRTBTT	MOB _{P3}	177	50
P3-r	CGAAAGCCAACATGAACATGHGGATKHTC			
P4-f	GCGTTCAGGATGGTCTBTCSATGCC	MOB _{P4}	163	64
P4-r	CGGTTTTGACCGTCAGATGSVMATGCGG			
P51-f	TACCACGCCCTATGCGAARAARTAYAC	MOB _{P51}	167	58
P51-r	CCCTTGCTCCTGGTGYTSNACCCA			
P52-f	GATAGCCTTGATTTAATAACACCAAYACYTAYAC	MOB _{P52}	175	58
P52-r	CCCTTGCTCCTGGTGYTSNACCCA			
P53-f	GGGCTCGCACGAYCAYACNNG	MOB _{P53}	345	65
P53-r	GCCAGCCCTTTTCRTGRTTGTG			
Q11-f	CAATCGTCCAAGGCGAARGCNGAYTA	MOB _{Q11}	331	50
Q11-r	CGCTCGGAGATCATCAYTYGAYTG			
Q12-f	CTGGAATATACTGAACACGGNAAYATGCC	MOB _{Q12}	341	52
Q12-r	ATCCTTGGTGTTAGCACGTTTAAARWAYTG			
Qu-f	AGCGCCGTGCTGTCCGCBGCNTAYCG	MOB _{Qu}	179	64
Qu-r	CTCCGACGCTCGRCSGCRITCCA			
H11-f	CCGGCGTCCGAGAAAYCAYCAYCA	MOB _{H11}	207	65-55*
H11-r	AAGGTCGTATACCTTYCCKGCRTRTG			
H121-f	GCCAGCTTCCGAATCACAYCAYCAYCG	MOB _{H121}	313	59
H121-r	GTCGCTTGTGCGGCCACCGDATRAARTA			
H2-f	AGTCCCAGCCTCAGAAATCCAYCAYCAYKC	MOB _{H2}	264	68
H2-r	GCGGACCGTGCCANGGRTGCCA			
C11-f	GTCAGGTCAGCGTGTGGGNCTNAC	MOB _{C11}	283	65-55*
C11-r	CTCTTCACGGTGCCCTCNACYTCRAA			
C12-f	GCACGACTGGAAAAATATCGCTATGGGGNATHAC	MOB _{C12}	257	59
C12-r	CAACGTGATAATCCCGTCRGGVCGRTG			

Referencias de oligonucleótidos degenerados: **H**: A, T o C; **V**: A, C o G; **D**: A, T o G; **B**: T, C o G; **W**: A o T; **S**: C o G; **K**: T o G; **M**: A o C; **Y**: C o T; **R**: A o G

*Se inicia con una T_A de 65 °C, la cual se reduce 1 °C en cada ciclo, durante los primeros 10, el resto de los ciclos se llevan a cabo a 55 °C

Los productos de amplificación fueron resueltos a 6V/cm en geles de agarosa al 2 % en buffer TAE 1X. Como colorante se utilizó GelRed y se utilizó el marcador de

peso molecular Ladder 100 bp. Los geles fueron visualizados con el transiluminador UV.

RESULTADOS

2.1 Prevalencia de aislamientos resistentes a CTG con fenotipo disociado

2.1.1 *Enterobacterales* con fenotipo de resistencia disociada a CTG

Como se mencionó en el capítulo previo, 60 aislamientos mostraron resistencia a cualquier CTG, y de estos, 15 (25%) mostraron el fenotipo CTX resistente y CAZ sensible (CTX^R y CAZ^S). Sin embargo, si se considera el total de aislamientos obtenidos durante el periodo evaluado la prevalencia de *Enterobacterales* con fenotipo de resistencia disociada a CTG es del 2,2% (IC₉₅ 1,32% - 3,67%) con un total de 15/675 aislamientos. Ningún aislamiento mostró el fenotipo disociado CTX sensible y CAZ resistente (CTX^S y CAZ^R).

2.1.2 *S. enterica* con fenotipo de resistencia disociada a CTG

Un total de 18 aislamientos de *S. enterica* mostraron resistencia a CTX, dentro de los cuales, solo 2/18 presentaron fenotipo de resistencia disociada a CTG, ambos productores de BLEE (CTX-M del grupo 9). Los aislamientos que mostraron este fenotipo fueron el 51 y el 188 (ver tabla 9, capítulo 1), ambos pertenecientes a la serovariedad Typhimurium. El único aislamiento productos de AmpC (CMY) plasmídica no mostró fenotipo disociado.

En este grupo de aislamientos se caracterizó la variante alélica de todas las enzimas presentes por secuenciación y comparación con base de datos. Todas las BLEE detectadas en *S. enterica* (con o sin resistencia disociada a CTX) corresponden a la variante CTX-M-14. La única AmpC plasmídica encontrada en el aislamiento de *S. enterica* fue caracterizada como CMY-2 (cepa 48). Los perfiles de sensibilidad para estos aislamientos se muestran en la tabla 9 (ver capítulo 1).

2.2 Distribución de especies con fenotipo disociado en *Enterobacterales*

Las especies que mostraron resistencia disociada con fenotipo CTX^R y CAZ^S fueron *E. coli*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae* y estos resultados se resumen en la figura 28. Ninguno de los aislamientos de *E. cloacae* o *S. marcescens* resistentes a CTG mostraron resistencia disociada. Considerando el número de aislamientos resistentes a CTG se observó un 68,8% (11/16) de resistencia disociada en *E. coli*, 60% (3/5) en *Proteus* spp. y 3,2% (1/31) en *K. pneumoniae*.

■ *E. coli* ■ *K. pneumoniae* ■ *P. mirabilis*

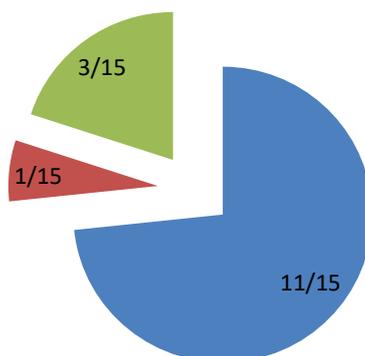


Figura 28: Distribución de especies que mostraron fenotipo de resistencia CTX^R y CAZ^S.

2.3 Caracterización fenotípica de los mecanismos de resistencia

La caracterización fenotípica de estos aislamientos muestra que 13/15 aislamientos son productores de BLEE y 2/15 de AmpC plasmídicas. En la figura 29 se muestra cómo se distribuyen ambos tipos de β-lactamasas entre las especies que mostraron fenotipo disociado a CTG.

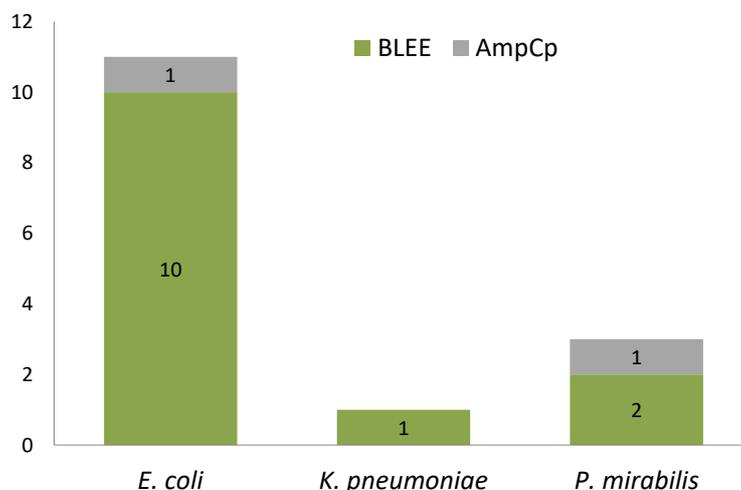


Figura 29: Distribución de BLEE y AmpC plasmídicas entre especies con fenotipo disociado a CTG.

2.4 β-lactamasas detectadas

2.4.1 BLEE

La caracterización genotípica mediante PCR y secuenciación permitió conocer las variantes de BLEE presentes en los aislamientos con fenotipo de resistencia disociada. Se caracterizaron las variantes CTX-M-2 (7/13), CTX-M-14 (5/13) y CTX-M-15 (1/13). La variante CTX-M-2 es la de mayor prevalencia entre los aislamientos con este fenotipo, se encontró mayormente en *E. coli*, en un total de 5 aislamientos,

seguido por *P. mirabilis* con 2 aislamientos. En segundo lugar aparece CTX-M-14, la cual fue encontrada en 4 aislamientos de *E. coli* y en el único aislamiento con fenotipo disociado de *K. pneumoniae*. Finalmente, un único aislamiento de *E. coli* fue portador de CTX-M-15. Estos resultados junto con los perfiles de sensibilidad obtenidos se resumen en la tabla 16.

Tabla 16: Origen, muestra, enzima caracterizada y perfil de sensibilidad de los 13 aislamientos con fenotipo de resistencia disociada productores de BLEE.

Especie y aislamiento	Hospital	Muestra	β -lactamasa	CIM (μ g/mL)								
				CTX	CAZ	FEP	IMI	GEN	CIP	TMS	NIT	
<i>E. coli</i>												
C17	A	Orina	CTX-M-14	8	1	1	1	8	2	0.5/9.5	32	
C24	A	PyPB	CTX-M-2	4	1	1	1	8	2	2/38	16	
I12	B	Orina	CTX-M-2	16	4	2	1	16	4	4/76	16	
I27	B	Orina	CTX-M-14	64	4	8	1	1	0.25	4/76	16	
N1	C	Orina	CTX-M-2	64	4	8	1	16	0.25	4/76	32	
N2	C	Orina	CTX-M-15	64	4	2	1	16	0.5	4/76	16	
N8	C	Orina	CTX-M-14	64	1	1	1	1	0.25	4/76	16	
N13	C	Orina	CTX-M-14	8	1	1	1	1	0.25	4/76	16	
N14	C	Orina	CTX-M-2	64	4	2	1	4	0.25	4/76	16	
N15	C	Orina	CTX-M-2	64	4	4	0.5	4	4	4/76	64	
<i>P. mirabilis</i>												
C13	A	Orina	CTX-M-2	64	2	1	1	8	2	2/38	128	
C21	A	Sangre	CTX-M-2	64	2	16	1	2	0.5	0.5/9.5	ND	
<i>K. pneumoniae</i>												
I26	B	Orina	CTX-M-14	64	1	2	1	1	0.25	0.5/9.5	64	

CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; IMI: imipenem; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; TMS: trimetoprima/sulfametoxazol; NIT: nitrofurantoina. ND: no determinado. PyPB: piel y partes blandas. A, B y C representan a los hospitales que aportaron los aislamientos para este estudio.

2.4.2 AmpC

Se caracterizaron 2 aislamientos con fenotipo de AmpC plasmídica con resistencia disociada a CTG. En ambos casos la enzima implicada fue CMY-2, las que fueron halladas en un aislamiento de *E. coli* y en otro de *P. mirabilis*. Estos resultados junto con los perfiles de sensibilidad obtenidos se resumen en la tabla 17.

Tabla 17: Origen, muestra, enzima caracterizada y perfil de sensibilidad de los 2 aislamientos con fenotipo de resistencia disociada productores de AmpC plasmídica.

Especie y aislamiento	Hospital	Muestra	β -lactamasa	CIM ($\mu\text{g/mL}$)							
				CTX	CAZ	FEP	IMI	GEN	CIP	TMS	NIT
<i>E. coli</i>											
C1	A	Orina	CMY-2	4	4	1	1	2	0.25	0.5/9.5	32
<i>P. mirabilis</i>											
I9	B	Orina	CMY-2	4	4	1	0.25	1	2	4/76	128

CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; IMI: imipenem; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; TMS: trimetoprima-sulfametoxazol; NIT: nitrofurantoina. A y B representan a los hospitales que aportaron los aislamientos para este estudio.

2.5 Transferencia de plásmidos y perfiles de sensibilidad

Se realizó ensayo de conjugación a todos los aislamientos de *Enterobacterales* con fenotipo de resistencia disociada a CTG. Todos los ensayos de conjugación se intentaron inicialmente con la cepa receptora TOP10; cuando no se obtuvieron transconjugantes, este ensayo de transferencia se repitió usando las otras dos cepas receptoras. A partir de los intentos de conjugación, 8/15 aislamientos con fenotipo disociado a CTG permitieron la obtención de transconjugantes. Los aislamientos que transfirieron ADN plasmídico fueron *E. coli* (C1, N1, N2, N14), *P. mirabilis* (C13, C21, I9) y *K. pneumoniae* (I26). Se obtuvieron transconjugantes a partir de los aislamientos N1, C13, C21, I9 e I26 y la cepa receptora TOP10; C1 y N14 con la cepa HB101; y N2 con la cepa receptora J53-B2. En la tabla 18 se resumen los transconjugantes obtenidos con las β -lactamasas transferidas en cada caso y los perfiles de sensibilidad correspondientes.

Se extrajo ADN plasmídico de los 7 aislamientos restantes (aquellos que resultaron negativos a los ensayos de conjugación) y se intentó transferir este ADN mediante electroporación, repetidas veces, con diferentes cepas receptoras, sin éxito.

A partir del análisis de los perfiles de sensibilidad de los transconjugantes obtenidos (Tabla 18) se observó que cuando el marcador de resistencia transferido fue CMY-2 o CTX-M-15 el transconjugante adquirió fenotipo de resistencia neta a CTG (CTX^R y CAZ^R), por el contrario, si el marcador transferido fue CTX-M-2 o CTX-M-14 el transconjugante adquiere fenotipo de resistencia disociada a CTG. A su vez, se observó que los aislamientos N1 y N2 además de transferir el gen *bla* correspondiente co-transferieron resistencia a GEN. A su vez, se observó que el aislamiento C21 mostró resistencia a FEP mientras que su transconjugante asociado fue sensible a este antibiótico, en contrapartida, los aislamientos C13, N2 y N14 fueron sensibles a FEP y

sus transconjugantes asociados presentaron sensibilidad disminuida (o SDD) a este β -lactámico (cefalosporina de cuarta generación).

Tabla 18: β -lactamasas transferidas y perfiles de sensibilidad de aislamientos clínicos, células receptoras y transconjugantes obtenidos.

Cepa o aislamiento	Gen de β -lactamasa transferido	CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$) / Interpretación					
		CTX	CAZ	FEP	GEN	STR*	RIF*
Cepas receptoras							
<i>E. coli</i> Top10	-	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	1 (S)	≥256	NE
<i>E. coli</i> HB101	-	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	≥256	NE
<i>E. coli</i> J53-B2	-	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)	NE	≥128
Aislamientos clínicos (cepas dadoras)							
<i>E. coli</i> C1	<i>bla</i> _{CMY-2}	4 (R)	4 (S)	1 (S)	2 (S)	2	NE
<i>P. mirabilis</i> C13	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	64 (R)	2 (S)	1 (S)	8 (I)	8	NE
<i>P. mirabilis</i> C21	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	64 (R)	2 (S)	16 (R)	2 (S)	2	NE
<i>E. coli</i> N1	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	64 (R)	4 (S)	8 (SDD)	16 (R)	2	NE
<i>E. coli</i> N2	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	64 (R)	4 (S)	2 (S)	16 (R)	256	≤1
<i>E. coli</i> N14	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	64 (R)	4 (S)	2 (S)	4 (S)	64	NE
<i>P. mirabilis</i> I9	<i>bla</i> _{CMY-2}	4 (R)	4 (S)	1 (S)	1 (S)	128	NE
<i>K. pneumoniae</i> I26	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	64 (R)	1 (S)	2 (S)	1 (S)	2	NE
Transconjugantes obtenidos							
TC C1 ^(H)	<i>bla</i> _{CMY-2}	16 (R)	32 (R)	1 (S)	1 (S)	≥256	NE
TC C13 ^(T)	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	64 (R)	8 (I)	4 (SDD)	16 (R)	≥256	NE
TC C21 ^(T)	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	64 (R)	4 (S)	2 (S)	1 (S)	≥256	NE
TC N1 ^(T)	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	64 (R)	8 (I)	8 (SDD)	16 (R)	≥256	NE
TC N2 ^(J)	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	64 (R)	16 (R)	4 (SDD)	16 (R)	NE	≥128
TC N14 ^(H)	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	64 (R)	4 (S)	8 (SDD)	16 (R)	≥256	NE
TC I9 ^(T)	<i>bla</i> _{CMY-2}	4 (R)	16 (R)	1 (S)	1 (S)	≥256	NE
TC I26 ^(T)	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	64 (R)	2 (S)	2 (S)	1 (S)	≥256	NE

*No hay interpretación de los valores de CIM para estos antibióticos

NE: CIM no evaluada

^(T)Transconjugante obtenido usando como cepa receptora *E. coli* TOP10

^(H)Transconjugante obtenido usando como cepa receptora *E. coli* HB101

^(J)Transconjugante obtenido usando como cepa receptora *E. coli* J53-B2

2.6 Perfil plasmídico de aislamientos y transconjugantes

Mediante el uso de la técnica de PFGE utilizando S1-nucleasa fue posible estimar la cantidad de plásmidos y sus tamaños en los aislamientos con fenotipo de resistencia disociada a CTG y sus transconjugantes asociados (Tabla 19). Solo se evaluó el perfil plasmídico para aquellos aislamientos para los que fue posible obtener transconjugantes. Los perfiles plasmídicos mostraron en todos los casos, que cada

transconjugante contenía una sola banda, que también estaba presente en el respectivo aislamiento dador. En la figura 30 se muestra a modo de ejemplo el PFGE-S1-nucleasa para el aislamiento de *E. coli* C1 y sus transconjugantes asociados.

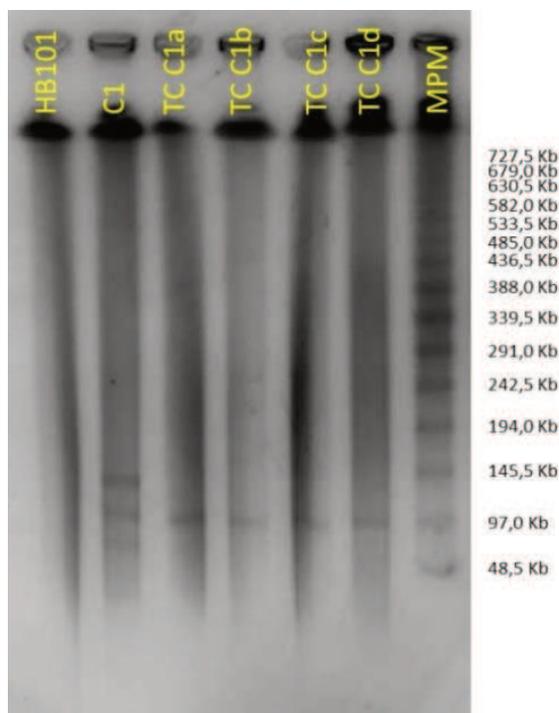


Figura 30: Electroforesis en gel de campos pulsados digeridos con S1-nucleasa para el aislamiento de *E. coli* C1 y sus transconjugantes asociados (a, b, c y d). Se observan tres bandas para el aislamiento C1 de tamaños estimados de 80 Kb, 100 Kb y 160 Kb, y para los transconjugantes asociados (TC C1a, TC C1b, TC C1c y TC C1d) se observa una única banda de aproximadamente 100 Kb. En la cepa receptora (HB101) no se observan bandas. La última calle corresponde al marcador de peso molecular (MPM) Lambda Ladder PFGE Marker.

A su vez, de esta manera, se vincularon los diferentes genes codificantes de β -lactamasas con el tamaño aproximado del plásmido que portaba cada una de ellos. Tanto es así, que en *E. coli* se observó que un plásmido de 100 Kb es portador de bla_{CMY-2} (aislamiento C1), un plásmido de 160 Kb (N1) y otro de 100 Kb (N14) son portadores de $bla_{CTX-M-2}$ y un plásmido de 100 Kb es portador de $bla_{CTX-M-15}$ (N2). En *P. mirabilis* se observaron 2 tamaños para plásmidos portadores de $bla_{CTX-M-2}$, 160 Kb (C13) y 80 Kb (C21), y un tamaño de 80 Kb para el plásmido portador de bla_{CMY-2} (I9). Para *K. pneumoniae* se describió un plásmido de aproximadamente 110 Kb como portador de $bla_{CTX-M-14}$ (I26). Lo descrito anteriormente se resume en la tabla 19.

No se evaluaron los aislamientos para los que no fue posible obtener transconjugantes ya que no sería posible reconocer al plásmido portador de la BLEE asociado al fenotipo estudiado.

Cabe destacar que 5 de los aislamientos evaluados (C1, I26, N1, N2 y N14) presentaron más de un plásmido (Tabla 19).

2.7 Grupos de incompatibilidad, sistemas de adicción y relaxasas

Los resultados obtenidos en la caracterización plasmídica de los aislamientos con resistencia disociada a CTG y transconjugantes mediante la identificación de grupos de incompatibilidad, sistemas de adicción y relaxasa MOB se resumen en la tabla 19. Es importante tener en cuenta que para poder asociar algunas de estas características al plásmido que porta la β -lactamasa es necesario contar con la cepa transconjugante para realizar las comparaciones pertinentes.

Los grupos de incompatibilidad mayormente encontrados fueron IncFIA, IncFIB e IncI1 en 10/15 aislamientos cada uno, seguido por IncA/C que apareció en 9/15 aislamientos (tener en cuenta que la metodología no discrimina entre los grupos IncA/C₁ e IncA/C₂) y IncB/O en 7/15 aislamientos. Los grupos IncK (en 5 aislamientos), IncF (en 4 aislamientos) e IncN (en 2 aislamientos) fueron encontrados solamente en *E. coli*. Por otro lado, IncFIC fue detectado únicamente en los 3 aislamientos de *P. mirabilis* estudiados. Al analizar los transconjugantes, se observa que IncI1 fue asociado a plásmidos portadores de las β -lactamasas CMY-2, CTX-M-15 y CTX-M-2 y los grupos IncA/C e IncN a CTX-M-2. Estas asociaciones descritas entre grupos de incompatibilidad y las diferentes β -lactamasas se encontraron en *E. coli*, no pudiéndose observar para *P. mirabilis* y *K. pneumoniae*, ya que en los transconjugantes obtenidos a partir de estas especies no fue posible determinar grupos de incompatibilidad mediante la metodología utilizada.

Por su parte, el sistema de adicción *ccdAB* fue encontrado en 9/15 aislamientos (en *E. coli* y *P. mirabilis*), mientras que *pndAC* (en las tres especies), *hok-sok* y *srnBC* (en *E. coli* y *P. mirabilis*) se detectaron en 8/15 aislamientos cada uno. Los sistemas *pemKI* y *vagCD* se encontraron en 4/15 aislamientos cada uno, todos pertenecientes a la especie *E. coli*. En 2 aislamientos de *E. coli* se detectó el sistema *parDE* y en 2 de *P. mirabilis* se identificó *relBE*. Solo en un transconjugante (TC C1) fue posible determinar los sistemas de adicción *ccdAB* y *pndAC* asociados al plásmido portador de CMY-2.

En cuanto a las relaxasas identificadas, se detectó MOB_{F12} en 3/11 aislamientos de *E. coli* con resistencia disociada, MOB_{P11} en 3 aislamientos, todos *E. coli*, MOB_{P12} en un aislamiento de *E. coli* y en el de *K. pneumoniae* y finalmente, MOB_{H121} en 2 aislamientos de *E. coli*. Sólo se caracterizó la relaxasa MOB_{H121} para el transconjugante correspondiente al aislamiento N1 productor de CTX-M-2.

Tabla 19: Perfil plasmídico observado en los aislamientos que conjugaron y los transconjugantes (TC) asociados. Descripción de grupos de incompatibilidad, sistemas de adición y relaxasas MOB detectadas.

Aislamiento / transconjugante	Especie	Tamaño estimado de los plásmidos (Kb)	β -lactamasa transferida	Grupos de incompatibilidad	Sistemas de adición	Relaxasas MOB
C1	<i>E. coli</i>	80/100/160	<i>bla</i> _{CMY-2}	I1; FIA; FIB; A/C; B/O	<i>pemKI</i> ; <i>ccdAB</i> ; <i>hok-sok</i> ; <i>pndAC</i>	P12; F12
TC C1	*	100		I1	<i>ccdAB</i> ; <i>pndAC</i>	-
C13	<i>P. mirabilis</i>	160	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	A/C; FIA; FIB; FIC	<i>relBE</i> ; <i>hok-sok</i>	-
TC C13	*	160		-	-	-
C21	<i>P. mirabilis</i>	80	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	FIC	<i>pndAC</i>	-
TC C21	*	80		-	-	-
N1	<i>E. coli</i>	80/100/160	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	I1; A/C	<i>ccdAB</i> ; <i>parDE</i> ; <i>hok-sok</i> ; <i>pndAC</i> ; <i>srnBC</i>	H121
TC N1	*	160		A/C	-	- H121
N2	<i>E. coli</i>	100/160	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	I1; FIB; K; A/C; B/O	-	-
TC N2	*	100		I1	-	-
N14	<i>E. coli</i>	50/100	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	I1; N; K; FIA; FIB; A/C; B/O	<i>ccdAB</i> ; <i>hok-sok</i> ; <i>srnBC</i>	F12; H121
TC N14	*	100		I1; N	-	-
I9	<i>P. mirabilis</i>	80	<i>bla</i> _{CMY-2}	FIA; FIC	<i>ccdAB</i> ; <i>relBE</i> ; <i>pndAC</i> ; <i>srnBC</i>	-
TC I9	*	80		-	-	-
I26	<i>K. pneumoniae</i>	110/130	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	I1; FIA; B/O	<i>pndAC</i>	P12
TC I26	*	110		-	-	-
C17	<i>E. coli</i>	NE	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	I1; FIA; FIB; A/C; F; B/O	<i>ccdAB</i> ; <i>vagCD</i> ; <i>hok-sok</i> ; <i>pndAC</i> ; <i>srnBC</i>	P11
C24	<i>E. coli</i>	NE	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	K; I1; FIA; FIB; A/C	<i>ccdAB</i> ; <i>parDE</i> ; <i>vagCD</i> ; <i>hok-sok</i>	-
I12	<i>E. coli</i>	NE	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	A/C; F	<i>pemKI</i> ; <i>ccdAB</i> ; <i>vagCD</i> ; <i>hok-sok</i> ; <i>srnBC</i>	F12
I27	<i>E. coli</i>	NE	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	I1; F; K; FIA; FIB; B/O	<i>pemKI</i>	P11; F12
N8	<i>E. coli</i>	NE	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	I1; F; K; FIA; FIB	<i>pemKI</i> ; <i>ccdAB</i> ; <i>hok-sok</i> ; <i>srnBC</i>	P11
N13	<i>E. coli</i>	NE	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	I1; N; FIB; A/C; B/O	<i>ccdAB</i> ; <i>pndAC</i> ; <i>srnBC</i>	-
N15	<i>E. coli</i>	NE	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F, K, FIA, FIB	<i>vagCD</i> ; <i>pndAC</i> ; <i>srnBC</i>	-

NE: no evaluado

- : resultado negativo

*Todos los transconjugantes son cepas de *E. coli*

DISCUSIÓN

2.1 El fenotipo disociado se presenta mayormente en *E. coli* y *P. mirabilis*

Se obtuvo una prevalencia del 2,2% de *Enterobacterales* con fenotipo de resistencia disociada a CTG, un valor relativamente bajo, pero si tenemos en cuenta el total estudiado de aislamientos con resistencia a cualquier CTG vemos que el porcentaje de enterobacterias con fenotipo de resistencia disociado es del 25%, lo que justifica profundizar el análisis sobre este tipo de aislamientos, en cuanto a perfiles de sensibilidad, mecanismos de resistencia implicados y el comportamiento que presentan frente a diferentes antibióticos.

En el Programa de Vigilancia Antimicrobiana (*Antimicrobial Surveillance Program*) del SENTRY (s.f.) se releva para la Argentina en el año 2019, un porcentaje de sensibilidad a CAZ para *Enterobacterales* del 75,93%, mientras que para CRO (cefalosporina análoga a CTX) el porcentaje de aislamientos sensibles se reduce a 72,08%. Estos valores muestran la diferencia entre las sensibilidades a las CTG de 3,85% lo que se correlaciona con los resultados obtenidos en este trabajo y con el contexto epidemiológico local, que está marcado por una alta prevalencia de enzimas del tipo cefotaximasas (Quinteros et al., 2003; Sennati et al., 2012).

Las principales especies en mostrar el fenotipo de resistencia disociado CTX^R y CAZ^S fueron *E. coli* (n=11), seguido por *P. mirabilis* (n=3) y solo un aislamiento de *K. pneumoniae* mostró esta característica. La presencia de aislamientos de *E. coli* y *P. mirabilis* con fenotipo disociado se ha observado en otros estudios (Benko et al., 2020; Lin et al., 2019; Seo et al., 2019), sin embargo, esta particularidad no es abordada con demasiada profundidad por los autores, probablemente asociado a la baja prevalencia que presentan este tipo de aislamientos en las regiones estudiadas. La alta frecuencia de aislamientos de *E. coli* (11/16) y *P. mirabilis* (3/5) con fenotipo de resistencia disociada a CTG, en comparación con lo observado en *K. pneumoniae* (1/31) permite sospechar que este caso podría considerarse una excepcionalidad y que la resultante en el fenotipo de resistencia podría deberse no sólo a la β -lactamasa caracterizada sino también a características intrínsecas de la especie *K. pneumoniae*, o la sumatoria de otro/s tipo/s de mecanismo de resistencia lo que explicaría las diferencias observadas entre especies. Por ejemplo, hay otros mecanismos que suelen estar presentes en *K. pneumoniae* capaces de modificar los valores de CIM a CTG como la expresión de *bla*_{SHV} constitutiva, la impermeabilidad causada por la reducción en la expresión de porinas OmpK35/OmpK36 y la expulsión de drogas mediante las bombas de eflujo tipo AcrAB-TolC en *K. pneumoniae* (Beceiro et al., 2013).

Por otro lado, no se puede descartar la posibilidad de entornos genéticos diferentes entre los distintos aislamientos los que podrían favorecer una mayor expresión de las enzimas en aquellos aislamientos que muestran resistencia neta a ambas CTG. Si bien en este trabajo no se evaluaron mecanismos accesorios a las β -lactamasas, se observó que la transferencia mediante conjugación a partir de aislamientos con fenotipo de resistencia disociada a CTG hacia cepas receptoras de *E. coli* (TOP10 y HB101) produjo células con resistencia neta a CTG, respaldando las hipótesis expuestas en el párrafo anterior.

2.2 El fenotipo disociado se vincula principalmente a CTX-M-2 y CTX-M-14

La caracterización fenotípica mostró una mayor cantidad de aislamientos productores de BLEE (13/15) comparado con los productores de AmpC plasmídicas (2/15). Este resultado es acorde a lo observado en trabajos locales (Cejas et al., 2012; Quinteros et al., 2003; Sennati et al., 2012), donde se observa una elevada prevalencia de enzimas del tipo CTX-M y un porcentaje más bajo de enzimas AmpC plasmídicas en aislamientos de *Enterobacterales* resistentes a CTG, más aún, teniendo en cuenta que aquí se evaluaron solamente los aislamientos con fenotipo de resistencia disociada, el cual se vincula con mayor frecuencia a las enzimas del tipo cefotaximasas y por lo general no es el perfil característico de las enzimas AmpC (Canton et al., 2012; Jacoby, 2009).

Dado que la mayoría de enzimas CTX-M hidrolizan CTX de manera más eficiente que CAZ (Gutkind et al., 2013), no es atípico encontrar este fenotipo en aislamientos clínicos debido a la alta frecuencia de aislamientos productores de CTX-M en nuestro país (Sennati et al., 2012). Esto se refleja en los resultados obtenidos en este trabajo donde, las β -lactamasas CTX-M-2 y CTX-M-14 fueron las mayoritariamente encontradas en los aislamientos con resistencia disociada a CTG, seguidas por CMY-2 y finalmente un único aislamiento con CTX-M-15. Sin embargo, debemos destacar que cuando CTX-M-14 aparece vinculada a *S. enterica* solo 2/17 aislamientos productores de esta enzima muestran fenotipo de resistencia disociada a CTG.

Como se mencionó previamente, la presencia de algunos tipos de cefotaximasas se correlaciona con el fenotipo observado, pero también cabe señalar que la resistencia disociada a CTG no se relaciona exclusivamente con la presencia de BLEE, ya que en este estudio hubo una baja proporción de aislamientos portadores de AmpC plasmídicas que mostraron fenotipo CTX^R y CAZ^S.

A pesar de que, en el total de aislamientos con resistencia a cualquiera de las CTG, las BLEE de mayor proporción fueron las CTX-M del grupo 1 (siendo CTX-M-15 la variante más prevalente del grupo), se encontró que CTX-M-2 (perteneciente a las CTX-M- del grupo 2) y CTX-M-14 (perteneciente a las CTX-M- del grupo 9) fueron las principales variantes que se asociaron al fenotipo de resistencia disociado a CTG especialmente en *E. coli* y *P. mirabilis*. Este fenómeno podría explicarse por al menos dos razones: 1) la eficiencia de hidrólisis de las diferentes enzimas y 2) por la proporción del tipo de BLEE en las distintas especies. 1) Generalmente, CTX es un mejor sustrato que CAZ para las enzimas CTX-M (como CTX-M-2 y CTX-M-14) debido a un entorno enzimático cercano al sitio activo más favorable que facilita el reconocimiento y la interacción de ese sustrato en comparación con la molécula más voluminosa de CAZ que dificulta la interacción. Sin embargo, existen variantes de CTX-M, como CTX-M-15, que producen valores de CIM hasta 8 veces más altos para CAZ. Se ha sugerido que varias sustituciones de aminoácidos en CTX-M-15 son responsables de este aumento en la hidrólisis de CAZ. Estos cambios conducen a una mayor flexibilidad y la remodelación del sitio activo para volverse más accesible a la molécula de CAZ (Gutkind et al., 2013). 2) Se ha encontrado en este trabajo una mayor asociación entre CTX-M-15 y *K. pneumoniae*, en comparación a la proporción de aislamientos de *E. coli* y *P. mirabilis* que expresan esta enzima. Este resultado no es novedoso ya que se ha reportado anteriormente una mayor prevalencia de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de CTX-M-15 en comparación a otras especies productoras de esta enzima (Rocha et al., 2016; Sennati et al., 2012). Esto explica en parte porque la mayoría de los aislamientos de *K. pneumoniae* no mostraron perfil de resistencia disociada a CTG.

Por otro lado, se observó que dos aislamientos productores de CMY-2 mostraron un fenotipo de resistencia disociada a CTG. Este es uno de los resultados más llamativos de este estudio, principalmente porque son muy poco frecuentes las publicaciones que informen de aislamientos productores de CMY-2 que muestren el perfil CTX^R y CAZ^S (Lin et al., 2019; Seo et al., 2019). Asimismo, cabe destacar que el perfil de hidrólisis de estos aislamientos es homogéneo (CIM de CTX y CAZ = 4 µg / mL) y se caracterizó como un perfil disociado según los puntos de corte establecidos por el CLSI (2010). Es importante señalar que las enzimas AmpC tienen una alta afinidad por ambas CTG (CTX y CAZ) (Gutkind et al., 2013; Jacoby, 2009). La resistencia por degradación enzimática del antibiótico surge cuando el organismo hiperproduce la enzima, alcanzando la concentración apropiada de CMY-2 en el espacio periplásmico (Gutkind et al., 2013). Una posible explicación para el fenotipo

CTX^R y CAZ^S en algunos aislamientos productores de CMY-2 podría estar relacionada con una disminución de la expresión o una menor producción de la enzima. A su vez, no se debe descartar que los aislamientos con fenotipo de resistencia disociada a CTG puedan presentar modificaciones que faciliten la entrada y el tiempo de residencia de los CTG dentro de la célula (Masi et al., 2017). Esta hipótesis no fue evaluada en este estudio.

2.3 Plásmidos: tamaño, grupos de incompatibilidad, sistemas de adicción y relaxasas

Si bien la tasa de transferencia de plásmidos por conjugación superó ligeramente el 50% (8/15), se observó que se transfirieron plásmidos portadores de todos los genes codificantes de las β-lactamasas (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CMY-2}) relacionadas al fenotipo de resistencia disociada a CTG observado en este estudio. Esto demuestra la enorme capacidad que presentan los plásmidos de resistencia para diseminarse entre diferentes especies bacterianas favoreciendo la dispersión de marcadores de resistencia entre aislamientos clínicos (Carattoli, 2009, 2013). Resultados similares fueron obtenidos en otros estudios (Lopatkin et al., 2017; Smillie et al., 2010) reforzando la evidencia de la habilidad que poseen los plásmidos de movilizar fácilmente determinantes de resistencia a antibióticos entre especies bacterianas, mediante conjugación, favoreciendo la supervivencia y selección de los aislamientos resistentes a los agentes antimicrobianos.

Por otro lado, se observó que 7/15 aislamientos fueron incapaces de transferir mediante conjugación los genes *bla*_{CTX-M}, este hecho puede atribuirse a dificultades generadas durante la técnica de conjugación, como por ejemplo en el diseño del sistema de selección o brindando condiciones inadecuadas durante el ensayo (Sambrook et al., 1989). Pero por otro lado, hay antecedentes de asociación entre genes *bla* y plásmidos no movilizables descritos previamente (Branger et al., 2018). En este caso, estos autores caracterizaron 2 plásmidos no movilizables, uno de ellos asociado a CTX-M-14. Otra posible explicación se encuentra en la migración de genes codificantes de diferentes β-lactamasas desde su locación habitual en plásmidos al cromosoma bacteriano como se ha documentado en aislamientos de *K. pneumoniae* que presentaron en sus cromosomas al gen *bla*_{CTX-M-15} (Gonzales-Escalante et al., 2021; Huang et al., 2017). Así, la asociación de genes de resistencia a plataformas no movilizables reduce la probabilidad de la transferencia horizontal de estos genes.

Por otro lado, se observó la co-transferencia de resistencia a aminoglucósidos. Algunos aislamientos (N1 y N2) transfirieron resistencia a GEN, además del fenotipo de resistencia a CTG. La co-expresión de marcadores de resistencia a β-lactámicos y

aminoglucósidos contenidos en el mismo plásmido es un hecho ampliamente documentado y encontrado en múltiples aislamientos a nivel mundial (Beceiro et al., 2013; Carattoli, 2009, 2013; Di Conza et al., 2002), y muchas veces, ambos genes se encuentran formando parte de una misma plataforma genética como por ejemplo en un integrón de clase 1 (Di Conza & Gutkind, 2010).

Al realizar la comparación de los perfiles de sensibilidad obtenidos para los aislamientos dadores y sus transconjugantes asociados se observó que cuando el determinante de resistencia transferido fue CMY-2 o CTX-M-15 los transconjugantes resultantes mostraron resistencia a ambas CTG (CTX y CAZ), por el contrario, si el mecanismo transferido fue CTX-M-2 o CTX-M-14, la célula receptora adquirió un fenotipo similar al de la célula dadora, mostrando solo resistencia a CTX y no a CAZ. La asociación entre el fenotipo de resistencia disociado a CTG en aislamientos de *Enterobacterales* y la producción de enzimas CTX-M del grupo 9, entre las que se encuentra CTX-M-14, no es un hallazgo novedoso, sino que ha sido reportado en otros estudios (Saba Villarroel et al., 2017; Williamson et al., 2012). Algo similar, en relación al fenotipo observado en este estudio, sucede en otros relevamientos y regiones geográficas para *E. coli* y *P. mirabilis* productores de CTX-M-2 (Arduino et al., 2003; Arduino et al., 2002; Nakano et al., 2012; Saba Villarroel et al., 2017).

La cantidad de plásmidos y sus tamaños aproximados, lo que se conoce como perfil plasmídico, se obtuvo para los aislamientos que conjugaron y sus transconjugantes asociados usando la técnica de PFGE utilizando S1-nucleasa como enzima de restricción. Se observó que 5/8 aislamientos presentaron más de un plásmido y que todos los transconjugantes obtenidos presentaron un único plásmido, lo que permitió asociar al gen de las distintas β -lactamasas caracterizadas con el tamaño del plásmido que la codifica, el grupo de incompatibilidad, sistemas de adicción o relaxasa. Gran parte de los grupos de incompatibilidad, sistemas toxina-antitoxina y relaxasas caracterizados en los aislamientos no fueron detectados en los respectivos transconjugantes, indicando que los mismos no están asociados a los plásmidos transferidos por conjugación.

El grupo IncI1 fue encontrado en 3 plásmidos transferidos, los cuales presentaron un tamaño aproximado de 100 Kb cada uno, y se asoció a los genes codificantes de 3 β -lactamasas (CTX-M-2, CTX-M-15 y CMY-2). Los plásmidos IncI1 han sido vinculados a la diseminación de CTX-M-15 en diferentes regiones y entornos (Egervarn et al., 2014; Ewers et al., 2014; Garcia-Fernandez et al., 2008; Haenni et al., 2014; Hordijk, Mevius, et al., 2013; Hordijk, Wagenaar, et al., 2013). Un tamaño semejante al determinado en los 3 plásmidos IncI1 estudiados también se observó en

otros plásmidos IncI1 vinculados a los genes codificantes de CTX-M-1 y CMY-2 (Ben Sallem et al., 2014; Leverstein-van Hall et al., 2011).

La asociación entre plásmidos IncI1 y *bla*_{CTX-M-2} ha sido ampliamente descrita y se encuentra en diferentes locaciones geográficas, ya sea en Sudamérica (Cunha et al., 2017; Monte et al., 2017) o en el resto del mundo (Carattoli, 2009; Sukmawinata et al., 2020). En otro estudio (Moura et al., 2018), se caracterizaron plásmidos IncI1 portadores de CTX-M-2 en aislamientos de *Salmonella* no tifoidea en Brasil, estos mostraron, además de la presencia de la enzima, un tamaño de aproximadamente 100 Kb, lo que coincide con el plásmido detectado en el aislamiento de *E. coli* (N14) estudiado en este trabajo (también caracterizado como IncN). La semejanza en los tamaños de los plásmidos IncI1 estudiados y los reportados en otros estudios nos permite sospechar de plataformas semejantes responsables de la diseminación de resistencia.

A su vez, plásmidos IncI1 de diversos tamaños han sido descritos como portadores de genes *bla*_{CTX-M-14} (Wong et al., 2016).

En un estudio local realizado en 2012 (Cejas et al., 2012) se describió la vinculación entre plásmidos IncI1 y CMY-2 en aislamientos de *E. coli* al igual que lo encontrado en este trabajo. Además, esta relación se observó en una investigación realizada en Colombia (Castellanos et al., 2017) llevada a cabo a nivel de la cadena de producción avícola de ese país, donde se muestra una elevada cantidad de aislamientos portadores de plásmidos IncI1 y CMY-2. También en Sudamérica, más precisamente en Brasil, se caracterizó un plásmido IncI1 de aproximadamente 100 Kb portador de *bla*_{CMY-2} en un aislamiento de *Salmonella* (Moura et al., 2018). Esta asociación, también se observa en aislamientos obtenidos en otras locaciones geográficas a nivel mundial (Ben Sallem et al., 2014; Haenni et al., 2014; van Hoek et al., 2015). Por otro lado, la vinculación encontrada en este estudio entre el plásmido IncI1 del aislamiento de *E. coli* C1 portador de *bla*_{CMY-2} y el sistema de adición *pnDAC* tiene antecedentes también en *E. coli* (Smith et al., 2015).

Como se mencionó previamente, el plásmido transferido mediante conjugación a partir del aislamiento de *E. coli* N14 y portador de *bla*_{CTX-M-2} presentó 2 grupos de incompatibilidad (IncI1 e IncN). La presencia de *bla*_{CTX-M-2} en plásmidos IncN ya ha sido documentada en otros trabajos científicos (Carattoli, 2013; Nakano et al., 2012), sin embargo, no fue posible hallar antecedentes de plásmidos híbridos que compartan los grupos IncI1 y N. Por otro lado, si hay estudios que muestran plásmidos IncN que co-transportan un grupo de incompatibilidad extra (Carattoli, 2013; Cardozo et al., 2021), donde coexisten los grupos IncN e IncF en plásmidos portadores de *bla*_{CTX-M-15}.

Un aislamiento de *E. coli* (N1) presentó un plásmido de aproximadamente 160 Kb, con grupo de incompatibilidad IncA/C, relaxasa MOB_{H121} y *bla*_{CTX-M-2}. La asociación entre plásmidos IncA/C y CTX-M-2 ha sido ampliamente descrita en diversas regiones de Sudamérica y el mundo (Carattoli, 2009; Castellanos et al., 2017; Zhao & Hu, 2013). La presencia de MOB_{H121} en el plásmido IncA/C estudiado se correlaciona con resultados previamente publicados (Alvarado et al., 2012) en relación al patrón de asociación que hay entre los diferentes grupos de incompatibilidad y las familias de relaxasas MOB.

Finalmente, se destaca que los genes *bla*_{CTX-M-2} y *bla*_{CMY-2} detectados en este estudio se encuentran asociados a plásmidos que presentan diferentes características, lo que se condice con diferentes entornos genéticos. A su vez, se pudo observar que se encontró un mismo marcador de resistencia (*bla*_{CTX-M-2}) en la misma especie bacteriana pero en diferentes plataformas lo que, probablemente, conduzca a diferencias en la diseminación y estabilidad de los plásmidos e incluso en la expresión de esta β-lactamasa.

CAPÍTULO 3

Cinética de muerte o letalidad

CAPÍTULO 3: Cinética de muerte o letalidad**INTRODUCCIÓN****3.1 Curvas de cinética de muerte o letalidad (estudios de tiempo de muerte)**

Las curvas de cinética de muerte se utilizan para examinar la velocidad a la que distintas concentraciones de un agente antimicrobiano matan un aislamiento bacteriano. Permiten estudiar las actividades bactericidas de los agentes antimicrobianos tanto dependientes de la concentración como dependientes del tiempo (Leber, 2016).

Consisten en agregar un inóculo estandarizado a caldos que contienen concentraciones de 2 x CIM y 4 x CIM de un agente antimicrobiano junto a un control de crecimiento. En el momento inicial de la inoculación y en determinados momentos a partir de entonces, se realizan recuentos microbiológicos en placa para determinar el número de bacterias viables (UFC/mL). Los resultados para el control y cada concentración de agente se representan gráficamente (\log_{10} UFC/mL vs Tiempo).

Las curvas de cinética de muerte se utilizan para evaluar nuevos agentes antimicrobianos y combinaciones de estos y ayudan a explicar los fracasos terapéuticos en las que la actividad bactericida puede ser crucial para el resultado del paciente (Leber, 2016). Estas curvas, al medir la actividad microbicida, son más relevantes para situaciones clínicas en la cual se necesita una terapia bactericida combinada (Méndez, 2012).

3.2 Tratamiento de infecciones causadas por bacterias productoras de β -lactamasas**3.2.1 Tratamiento de las infecciones por bacterias productoras de BLEE**

Para la selección de una terapia adecuada hay que tener en cuenta que los únicos β -lactámicos que mantienen actividad frente a *Enterobacterales* productores de BLEE son, además de cefoxitina, las combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas y carbapenemes. La cefoxitina es frecuentemente activa y podría ser usada, pero este antibiótico desarrolla fácilmente resistencia por alteraciones de la permeabilidad, por lo que no se recomienda. Hay pocos estudios acerca de la posibilidad de uso de la cefoxitina como tratamiento de estas infecciones. En aquellos casos en los que se ha usado, la infección vuelve a aparecer, pero con aislamientos resistentes a este antibiótico, es decir, se seleccionan mutantes resistentes por permeabilidad (Lee et al., 2006). Sin embargo, es una posibilidad de tratamiento cuando no existe ninguna otra alternativa. Otra alternativa es el uso de combinaciones

de penicilinas con inhibidores de β -lactamasas. Su uso dependerá de las CIM que presente el microorganismo a tratar, ya que se han descrito casos de resistencia por hiperproducción de BLEE y por producción conjunta de una BLEE y otro tipo de β -lactamasa (Spanu et al., 2002). Las combinaciones más usadas son amoxicilina/ácido clavulánico y piperacilina/tazobactam. Sin embargo, se recomienda no utilizar estos antibióticos en tratamientos empíricos, y reservarlos hasta conocer el resultado de las pruebas de sensibilidad y para infecciones de baja gravedad (Dhillon & Clark, 2012). La utilización de CTG en el tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacterales* productores de BLEE ha mostrado resultados adversos, produciendo fallas terapéuticas, aun cuando las CIM de estos antibióticos se incluyan dentro del intervalo de sensibilidad (Paterson, Ko, et al., 2001). Una situación semejante se produjo cuando se evaluó cefepime como alternativa de tratamiento, observándose altas tasas de fracaso terapéutico, con respecto a los tratamientos con carbapenemes (Kotapati et al., 2005). Los carbapenemes (imipenem, meropenem y ertapenem) son los antibióticos β -lactámicos más activos frente a enterobacterias productoras de BLEE. Estos antibióticos son muy resistentes a la hidrólisis por estas β -lactamasas y muestran una elevada y rápida actividad bactericida (Dhillon & Clark, 2012). No obstante, el uso de estos β -lactámicos debe ser moderado debido al aumento de resistencia a los mismos (Patel & Bonomo, 2013). En cuanto al uso de antibióticos no β -lactámicos para el tratamiento de las infecciones por *Enterobacterales* productores de BLEE, las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos resultan una buena alternativa en aislamientos sensibles. Sin embargo, es preciso tener en cuenta la frecuente coexistencia de determinantes genéticos que confieren resistencia a estos otros antimicrobianos. En muchos casos la resistencia se transfiere o moviliza conjuntamente con el gen codificante de BLEE, ya que se localizan en el mismo transposón, integrón o plásmido. Otras alternativas terapéuticas son la fosfomicina, las polimixinas y la nitrofurantoína (Dhillon & Clark, 2012).

3.2.2 Tratamiento de las infecciones por bacterias productoras de AmpC plasmídicas

En principio deben evitarse los tratamientos con penicilinas de amplio espectro, CTG y las combinaciones de β -lactámicos con inhibidores (Pai et al., 2004). Sin embargo, cefepime es un inductor débil que, además muestra alta penetrabilidad a través de la membrana externa y prácticamente no es hidrolizado por las enzimas AmpC. Estas propiedades posibilitan que sea una opción en el tratamiento de infecciones por *Enterobacterales* productores de AmpC, pero debe tenerse en cuenta que su actividad es dependiente del inóculo por lo que se sugiere precaución en su

uso (Kang et al., 2004). Pueden aparecer además aislamientos resistentes a esta cefalosporina por cambios en la permeabilidad originado por la reducción del número de porinas (mutantes con expresión reducida de porinas) (Tamma et al., 2019). En esta circunstancia o en el caso de infecciones graves causadas por *Enterobacterales* productores de AmpC los antibióticos de elección son los carbapenemes. Por lo general la terapia con carbapenemes es eficiente y exitosa, pero también puede promover la aparición de bacterias, especialmente *K. pneumoniae* resistente a este grupo de β -lactámicos por reducción o pérdida de porinas (Jacoby, 2009).

Muchos aislamientos productores de AmpC plasmídicas presentan resistencia a otras familias de antibióticos, lo que dificulta la elección de una terapia efectiva. Para casos que no revisten riesgo de vida y para aislamientos sensibles es posible el tratamiento con fluoroquinolonas o tetraciclinas (Jacoby, 2009).

3.2.3 Tratamiento de las infecciones por bacterias productoras de carbapenemasas

Las opciones para el tratamiento de pacientes infectados por *Enterobacterales* resistentes a carbapenemes son limitadas. Además de tener resistencia a los β -lactámicos presentan resistencias asociadas a otros grupos de antimicrobianos, tales como fluoroquinolonas, aminoglucósidos y trimetoprima/sulfametoxazol. Hasta la fecha, los carbapenemes todavía se consideran una terapia de última línea frente a aislamientos multirresistentes (Hammoudi Halat & Ayoub Moubareck, 2020). Este contexto, ha generado la necesidad de reintroducir ciertos antibióticos como las polimixinas y la fosfomicina y la utilización de tigeciclina en infecciones causadas por *Enterobacterales* resistentes a carbapenemes (Patel & Bonomo, 2013) y actualmente se opta por estrategias terapéuticas combinadas para tratar esta clase de infecciones. Estas incluyen tigeciclina en dosis altas, con infusión prolongada de carbapenem en dosis altas y terapia con doble carbapenem (Hammoudi Halat & Ayoub Moubareck, 2020). Recientemente se han introducidos nuevos inhibidores, como el avibactam (un inhibidor no β -lactámico) (Lagace-Wiens et al., 2011), y una combinación ya disponible como ceftazidima/avibactam, es activa frente a enterobacterias productoras de serino-carbapenemasas como KPC y OXA-48, pero no son efectivas contra productores de MBL (Sheu et al., 2019).

3.2.4 Opciones terapéuticas para aislamientos con resistencia disociada

A partir de los lineamientos introducidos en 2010 por el CLSI donde se indica que los perfiles de sensibilidad deben ser informados como tales, independientemente del mecanismo implicado en producirlos, aparece como posible alternativa terapéutica

el uso de aquellos antibióticos para los que el aislamiento muestre sensibilidad *in vitro*. De esta manera, en teoría, un aislamiento productor de BLEE que muestre un perfil disociado (CTX^R y CAZ^S) podría ser tratado con ceftazidima. No se disponen de suficientes estudios que avalen esta hipótesis, por lo que en contextos epidemiológicos como el de nuestro país esta tesitura no es recomendada por las sociedades científicas que sugieren la búsqueda del mecanismo causal del fenotipo para definir el tratamiento (Comunicación oral, VIII congreso SADEBAC 2018). En este contexto, a pesar de presentar un fenotipo de resistencia disociada a CTG, los aislamientos deben ser considerados como resistentes a todas las CTG y tratarse en consecuencia, como se mencionó previamente para cada caso en particular considerando el mecanismo de resistencia responsable (BLEE, AmpC, etc.).

3.2.5 Terapias combinadas para el tratamiento de *Enterobacterales* productores de BLEE o AmpC

Para el tratamiento de infecciones graves causadas por bacterias productoras de BLEE o AmpC los carbapenemes son los antibióticos de elección. Sin embargo, la aparición de resistencia, mediada por carbapenemasas, es motivo de preocupación debido al uso generalizado de carbapenemes. Un mayor uso empírico de carbapenemes, en respuesta a una mayor prevalencia de aislamientos productores de BLEE o AmpC, puede ir acompañado de una rápida aparición y diseminación de la resistencia a este grupo de β -lactámicos en otros patógenos (Cha et al., 2015). Por lo tanto, se deben considerar alternativas a los carbapenemes en el tratamiento empírico ante la sospecha de sepsis por gram negativos. En este contexto, una alternativa es la terapia combinada. El propósito inicial de la terapia combinada es ampliar la cobertura empírica proporcionada por dos agentes antimicrobianos con diferentes espectros de actividad. Las ventajas incluyen la posibilidad teórica de minimizar la aparición de resistencia a los antimicrobianos y las posibles interacciones sinérgicas (Chow & Yu, 1999). Para las infecciones causadas por bacterias gram negativas, se ha observado sinergia antimicrobiana en el tratamiento combinado usando β -lactámicos y aminoglucósidos (Cha et al., 2015). Es una interacción deseable la sinergia entre un aminoglucósido y un antibiótico activo frente a la pared celular (penicilinas, cefalosporinas, monobactams, carbapenems, glucopéptidos). Los antibióticos activos frente a la pared celular favorecerían la captación de aminoglucósidos incrementando las concentraciones intracelulares de estos antibióticos. El efecto de los fármacos en combinación es mayor que los resultados anticipados de cada fármaco por separado. En resumen, el efecto es más que aditivo (Gilbert & Leggett, 2012). Los resultados

obtenidos por Bayer et al. (1984) muestran un incremento frecuente y rápido en la actividad bactericida *in vitro*, cuando se combinan CTG y aminoglucósidos contra aislamientos nosocomiales de *Enterobacterales*. En tratamientos de endocarditis causada por *K. pneumoniae* productora de BLEE, la combinación de piperacilina/tazobactam y gentamicina mostró efecto sinérgico (Rodríguez-Bano et al., 2015).

Otras combinaciones que muestran buenos resultados en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias productores de BLEE son las que involucran a la tigeciclina en combinación con ceftazidima o cefepime (Eckmann et al., 2011; Heizmann et al., 2015). Los β -lactámicos tales como ceftazidima, cefepime y piperacilina/tazobactam en combinación con fluoroquinolonas muestran efecto sinérgico incrementando la sensibilidad de los aislamientos de *Enterobacterales* productores de BLEE (Cha et al., 2015). Por último, la combinación entre un aminoglucósido y fosfomicina muestra sinergia en el tratamiento frente a infecciones causadas por *K. pneumoniae* y *E. coli* productores de BLEE (Rodríguez-Bano et al., 2015). Aunque el papel de la terapia combinada en la sepsis por gram negativos ha sido controvertido con respecto a los efectos sinérgicos, es cada vez más importante lograr terapias antimicrobianas empíricas adecuadas (Cha et al., 2015).

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

- Evaluar el comportamiento *in vitro* mediante curvas de cinética de muerte de aislamientos productores de CTX-M-2 y CTX-M-14 con fenotipo de resistencia disociada a CTG frente a CAZ y FEP.
- Evaluar el comportamiento *in vitro* mediante curvas de cinética de muerte de transconjugantes productores de CTX-M-2 y CTX-M-14 frente a CAZ.
- Evaluar el comportamiento *in vitro* mediante curvas de cinética de muerte de aislamientos productores de CMY-2 con fenotipo de resistencia disociada a CTG frente a CAZ, CTX, FEP y GEN.
- Evaluar el comportamiento *in vitro* mediante curvas de cinética de muerte de transconjugantes productores de CMY-2 frente a FEP.
- Evaluar sinergia *in vitro* entre CAZ y GEN frente a aislamientos productores de CMY-2 con fenotipo de resistencia disociada a CTG.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Curvas de cinética de muerte o letalidad

3.1.1 Determinación de actividad bactericida. Estudios de cinética de muerte usando un único antibiótico

Se partió de un cultivo puro de 24 h de incubación a 35-37 °C y se preparó un inóculo de la bacteria a evaluar en solución fisiológica estéril, ajustando la turbidez al 0,5 de la escala de McFarland. Posteriormente, se hizo una dilución 1/2 de este inóculo y se colocaron 100 µL del mismo en un frasco conteniendo 9,9 mL de caldo Mueller Hinton (Britania, Argentina) (tubo control). En paralelo, se colocaron 100 µL en cada uno de los frascos conteniendo 9,8 mL de caldo Mueller Hinton a los que posteriormente se les adicionó 100 µL de las diferentes soluciones de antibióticos evaluados. Estas soluciones fueron preparadas en dos concentraciones diferentes con el propósito de alcanzar concentraciones finales de 2 x CIM y 4 x CIM de cada aislamiento o transconjugante enfrentado a los diferentes antibióticos.

Los frascos se incubaron a 35-37 °C sin agitación y se realizaron recuentos de células viables a diferentes tiempos pre y post-incubación (0, 3, 6 y 24 h). Para llevar a cabo los recuentos, a cada tiempo se hicieron diluciones decimales seriadas en solución fisiológica estéril (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , etc). La cantidad de diluciones realizadas depende del tiempo de incubación y del crecimiento o muerte celular estimada por la turbidez del cultivo (análisis visual).

De cada dilución se tomaron 100 µL, se depositaron sobre la superficie de una placa de ATS (Britania, Argentina) y se esparcieron con espátula de Drigalsky. Se realizó este procedimiento por duplicado. Las placas se incubaron a 35-37 °C durante 24 h y posteriormente se realizó el recuento de colonias.

Con estos resultados se construyó una curva de cinética de muerte de 24 h para cada aislamiento y transconjugante (Log_{10} UFC/mL vs Tiempo).

Se consideró como actividad bactericida o bactericidia a una disminución en $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL en los recuentos bacterianos en el medio con antibiótico en comparación con el recuento inicial (French, 2006).

La actividad bactericida de CAZ y FEP fue evaluada en 2 aislamientos productores de CTX-M-2 (*E. coli* N1 y *P. mirabilis* C13) y 2 productores de CTX-M-14 (*E. coli* N8 y *K. pneumoniae* I26). A su vez, se evaluó dicho efecto sobre las transconjugantes obtenidos asociados a estos aislamientos (TC N1, TC C13 y TC I26) usando CAZ como antibiótico. Los aislamientos y transconjugantes ensayados se resumen en la tabla 20.

CAPÍTULO 3 - MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 20: Aislamientos y transconjugantes productores de BLEE y concentraciones de antibióticos usadas en los estudios de cinética de muerte.

Aislamiento / Transconjugante	BLEE	Concentración de CAZ (µg/mL)		Concentración de FEP (µg/mL)	
		2 x CIM	4 x CIM	2 x CIM	4 x CIM
		<i>E. coli</i> N1	CTX-M-2	8	16
<i>P. mirabilis</i> C13	CTX-M-2	4	8	2	4
<i>E. coli</i> N8	CTX-M-14	2	4	2	4
<i>K. pneumoniae</i> I26	CTX-M-14	2	4	4	8
TC N1	CTX-M-2	16	32	-	-
TC C13	CTX-M-2	16	32	-	-
TC I26	CTX-M-14	4	8	-	-

Por otro lado, se evaluó la actividad bactericida de CAZ, CTX, FEP, GEN frente a 2 aislamientos productores de CMY-2 (*E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9). Además, se evaluó este efecto sobre los transconjugantes asociados a estos aislamientos (TC C1 y TC I9) usando FEP como antibiótico (los transconjugantes fueron resistentes a CAZ). Los aislamientos y transconjugantes ensayados se resumen en la tabla 21.

Tabla 21: Aislamientos y transconjugantes productores de AmpCp y concentraciones de antibióticos usadas en los estudios de cinética de muerte.

Aislamiento / Transconjugante	AmpC	Conc. de CAZ (µg/mL)		Conc. de CTX (µg/mL)		Conc. de FEP (µg/mL)		Conc. de GEN (µg/mL)	
		2 x CIM	4 x CIM						
		<i>E. coli</i> C1	CMY-2	8	16	8	16	2	4
<i>P. mirabilis</i> I9	CMY-2	8	16	8	16	2	4	2	4
TC N1	CMY-2	-	-	-	-	2	4	-	-
TC I9	CMY-2	-	-	-	-	2	4	-	-

Todos los aislamientos evaluados mediante curvas de cinética de muerte fueron aislados de muestras de orina (ver capítulo 1).

3.1.2 Determinación de sinergia. Estudios de cinética de muerte usando combinación de dos antibióticos

Se utilizaron curvas de letalidad para estudiar la dinámica del sinergismo para la combinación de CAZ y GEN determinando el número de bacterias viables que quedan a lo largo del tiempo después de la exposición a cada agente individual y diferentes combinaciones.

Se partió de un cultivo puro de 24 h de incubación a 35-37 °C y se preparó un inóculo de la bacteria a evaluar en solución fisiológica estéril, ajustando la turbidez al

0,5 de la escala de McFarland. Posteriormente, se hizo una dilución 1/2 de este inóculo y se colocaron 100 μ L del mismo en un frasco conteniendo 9,9 mL de caldo Mueller Hinton (control). En paralelo, se colocaron 100 μ L en cada uno de los frascos conteniendo 9,7 mL de caldo Mueller Hinton a los que posteriormente se les adicionó 100 μ L de ambas soluciones de antibióticos a los que se les evaluó la sinergia. Estas soluciones fueron preparadas en dos concentraciones diferentes con el propósito de alcanzar concentraciones finales de 2 x CIM y 4 x CIM de cada aislamiento para cada antibiótico.

La incubación y los recuentos se realizaron según los procedimientos explicados en la sección “Determinación de actividad bactericida. Estudios de cinética de muerte usando un único antibiótico”.

Con estos resultados se construyó una curva de cinética de muerte de 24 h para cada aislamiento y transconjugante (Log_{10} UFC/mL vs Tiempo).

Aplicando las curvas de cinética de muerte la sinergia se obtiene cuando, luego de 24 horas de incubación, el recuento se reduce en $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL en presencia de los dos antimicrobianos, respecto al antimicrobiano más activo (Leber, 2016).

Se determinó la sinergia de la combinación de CAZ y GEN frente a los aislamientos productores de CMY-2 (*E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9).

Para el aislamiento C1 se usaron las siguientes concentraciones de cada antibiótico: 8 μ g/mL de CAZ y 4 μ g/mL de GEN para 2 x CIM; y 16 μ g/mL de CAZ y 8 μ g/mL de GEN para 4 x CIM (Tabla 21).

Para el aislamiento I9 se usaron las concentraciones de 8 μ g/mL de CAZ y 2 μ g/mL de GEN para 2 x CIM; y 16 μ g/mL de CAZ y 4 μ g/mL de GEN para 4 x CIM (Tabla 21).

RESULTADOS

3.1 Curvas de cinética de muerte (Actividad bactericida)

3.1.1 Aislamientos productores de CTX-M-2 y CTX-M-14 frente a CAZ

Se ensayaron curvas de cinética de muerte para aislamientos productores de BLEE frente a concentraciones de CAZ de 2 x CIM y 4 x CIM para cada aislamiento. Los aislamientos seleccionados para este ensayo fueron *E. coli* N1 (CTX-M-2), *E. coli* N8 (CTX-M-14), *K. pneumoniae* I26 (CTX-M-14) y *P. mirabilis* C13 (CTX-M-2).

Se observó efecto bactericida sobre los 4 aislamientos estudiados a las 24 h de incubación (Figura 31). Durante las primeras etapas del estudio, a las 3 y 6 h de incubación, se observó la acción antimicrobiana de CAZ mediante la disminución del número de bacterias viables, aunque a este tiempo no se alcanzó el efecto bactericida en ninguno de los aislamientos a ambas concentraciones evaluadas (2 x CIM y 4 x CIM).

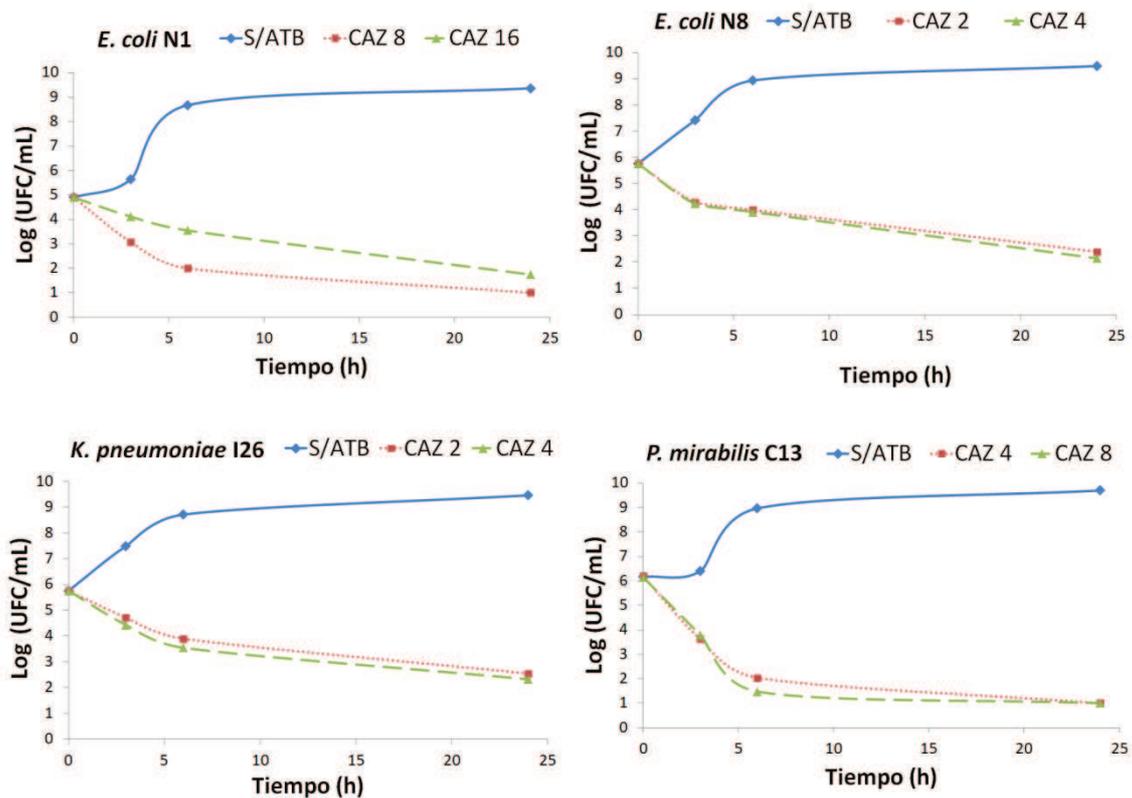


Figura 31: Curvas de cinética de muerte para los aislamientos productores de BLEE frente a CAZ. Aislamientos evaluados: *E. coli* N1 (CTX-M-2), *E. coli* N8 (CTX-M-14), *K. pneumoniae* I26 (CTX-M-14) y *P. mirabilis* C13 (CTX-M-2). Las líneas continuas azules indican el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo sin antibiótico, mientras que, las líneas de puntos rojos corresponden a la concentración de CAZ de 2 x CIM y las verdes a 4 x CIM. Los números en la leyenda superior corresponden a la concentración de CAZ evaluada en cada caso en $\mu\text{g/mL}$.

3.1.2 Aislamientos productores de CTX-M-2 y CTX-M-14 frente a FEP

Se ensayaron curvas de cinética de muerte para los mismos 4 aislamientos productores de BLEE que se enfrentaron a CAZ, usando concentraciones de FEP de 2 x CIM y 4 x CIM para cada bacteria.

En ninguno de los 4 aislamientos ensayados se observó efecto bactericida, obteniéndose recrecimiento en todos los casos (Figura 32). Durante la primera etapa del estudio, a las 3 h de incubación, se observa la acción antimicrobiana de FEP en los aislamientos de *E. coli* N1, *E. coli* N8 y *K. pneumoniae* I26. Se evidenció este efecto mediante la disminución del número de bacterias viables a ambas concentraciones evaluadas (2 x CIM y 4 x CIM). Para las 6 h de incubación se incrementó el número de células viables (recrecimiento) en los 4 aislamientos, comportamiento que se acentuó en el final del ensayo. El recrecimiento observado indicó que FEP no presenta efecto bactericida en los aislamientos productores de BLEE enfrentados a esta cefalosporina de cuarta generación.

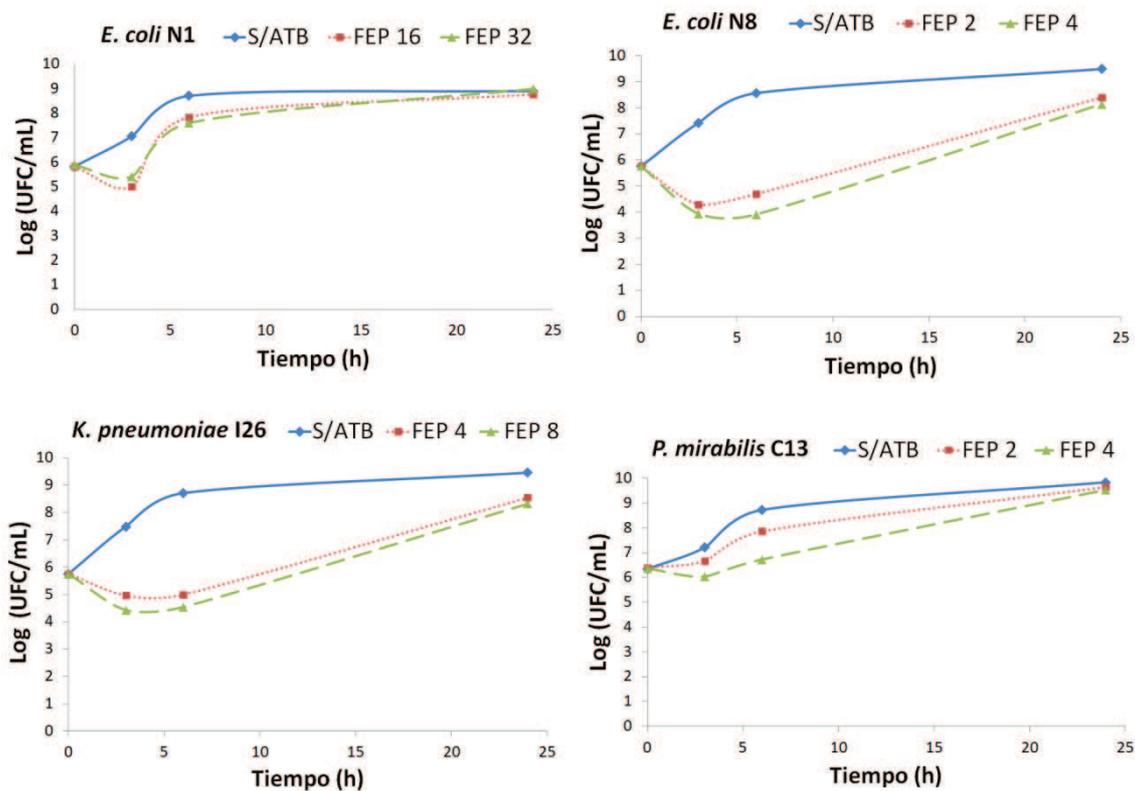


Figura 32: Curvas de cinética de muerte para los aislamientos productores de BLEE frente a FEP. Aislamientos evaluados: *E. coli* N1 (CTX-M-2), *E. coli* N8 (CTX-M-14), *K. pneumoniae* I26 (CTX-M-14) y *P. mirabilis* C13 (CTX-M-2). Las líneas continuas azules indican el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo sin antibiótico, mientras que, las líneas de puntos rojos corresponden a la concentración de FEP de 2 x CIM y las verdes a 4 x CIM. Los números en la leyenda superior corresponden a la concentración de FEP evaluada en cada caso en µg/mL.

3.1.3 Transconjugantes productores de CTX-M-2 y CTX-M-14 frente a CAZ

Se ensayaron curvas de cinética de muerte para los transconjugantes productores de BLEE frente a concentraciones de CAZ de 2 x CIM y 4 x CIM. Los transconjugantes usados para este ensayo fueron TC N1 (CTX-M-2), TC C13 (CTX-M-2) y TC I26 (CTX-M-14). Estos transconjugantes fueron obtenidos en ensayos de conjugación a partir de los aislamientos N1, C13 e I26. Para el aislamiento N8 no fue posible obtener su transconjugante asociado.

Se observó efecto bactericida sobre los 3 transconjugantes estudiados a las 24 h de incubación (Figura 33). Durante la primera etapa del estudio, a las 3 y 6 h de incubación, se observó la acción antimicrobiana de CAZ mediante la disminución del número de bacterias viables, donde solo se alcanzó el efecto bactericida tras 6 h de incubación para el TC C13 a ambas concentraciones (2 x CIM y 4 x CIM).

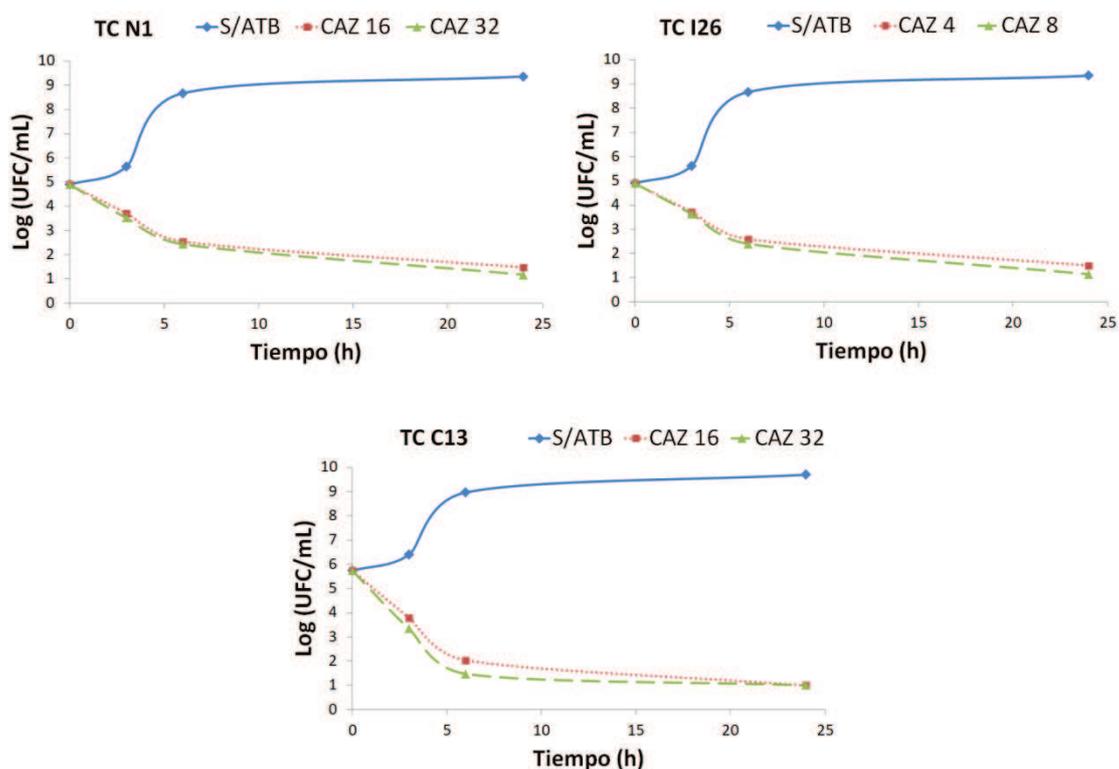


Figura 33: Curvas de cinética de muerte para los transconjugantes productores de BLEE frente a CAZ. Transconjugantes evaluados: TC N1 (CTX-M-2), TC I26 (CTX-M-14) y TC C13 (CTX-M-2). Las líneas continuas azules indican el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo sin antibiótico, mientras que, las líneas de puntos rojos corresponden a la concentración de CAZ de 2 x CIM y las verdes a 4 x CIM. Los números en la leyenda superior corresponden a la concentración de CAZ evaluada en cada caso en $\mu\text{g/mL}$.

3.1.4 Aislamientos productores de CMY-2 frente a CAZ

Se ensayaron curvas de cinética de muerte para 2 aislamientos productores de CMY-2 frente a concentraciones de CAZ de 2 x CIM y 4 x CIM para cada bacteria. Los aislamientos seleccionados para este ensayo fueron *E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9.

En ninguno de los 2 aislamientos estudiados se obtuvo efecto bactericida, observándose recrecimiento de las dos bacterias hacia el final del ensayo (Figura 34). En ambos aislamientos, hasta las 6 h de incubación, se evidencia la actividad antimicrobiana del antibiótico mediante la disminución del número de bacterias viables cuando se utilizó la concentración de 4 x CIM (16 µg/mL). Para la concentración de 2 x CIM en el aislamiento C1 ya se comienza a evidenciar el recrecimiento a las 6 h de incubación.

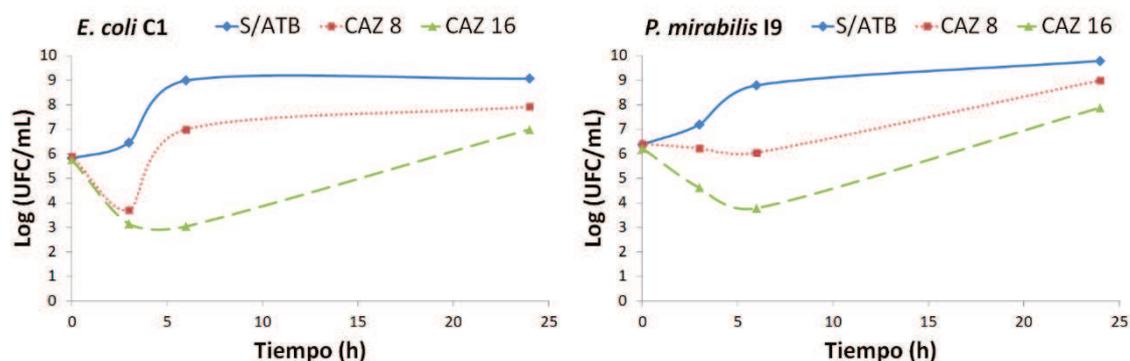


Figura 34: Curvas de cinética de muerte para los aislamientos productores de CMY-2 frente a CAZ. Aislamientos evaluados: *E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9. Las líneas continuas azules indican el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo sin antibiótico, mientras que, las líneas de puntos rojos corresponden a la concentración de CAZ de 2 x CIM y las verdes a 4 x CIM. Los números en la leyenda superior corresponden a la concentración de CAZ evaluada en cada caso en µg/mL.

3.1.5 Aislamientos productores de CMY-2 frente a CTX

Se ensayaron curvas de cinética de muerte para 2 aislamientos productores de CMY-2 (*E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9) frente a concentraciones de CTX de 2 x CIM y 4 x CIM para cada bacteria.

En ninguno de los 2 aislamientos estudiados se obtuvo efecto bactericida de CTX, observándose recrecimiento de las dos bacterias hacia el final del ensayo (Figura 35). En ambos aislamientos, hasta las 3 h de incubación, se evidencia la actividad antimicrobiana del antibiótico mediante la disminución del número de bacterias viables para ambas concentraciones (8 µg/mL y 16 µg/mL). Para las 6 h de incubación ya se comienza a evidenciar recrecimiento, el cual se acentúa hacia el final del ensayo.

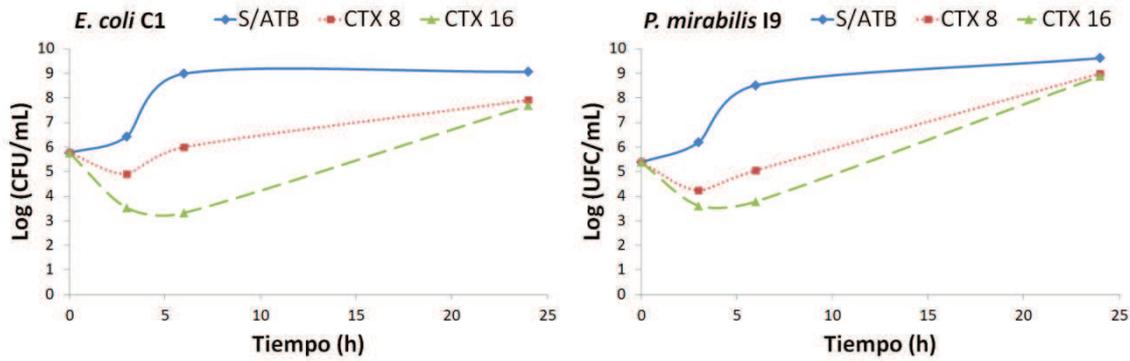


Figura 35: Curvas de cinética de muerte para los aislamientos productores de CMY-2 frente a CTX. Aislamientos evaluados: *E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9. Las líneas continuas azules indican el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo sin antibiótico, mientras que, las líneas de puntos rojos corresponden a la concentración de CTX de 2 x CIM y las verdes a 4 x CIM. Los números en la leyenda superior corresponden a la concentración de CTX evaluada en cada caso en $\mu\text{g/mL}$.

3.1.6 Aislamientos productores de CMY-2 frente a FEP

Se ensayaron curvas de cinética de muerte para 2 aislamientos productores de CMY-2 (*E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9) frente a concentraciones de FEP de 2 x CIM y 4 x CIM para cada bacteria.

Se observó efecto bactericida sobre los 2 aislamientos estudiados a las 24 h de incubación (Figura 36). La actividad antimicrobiana se evidencia a partir de las 3 h de cultivo, siendo más marcada en el aislamiento C1, en el cual ya se alcanza el efecto bactericida a este tiempo a ambas concentraciones evaluadas. Para el aislamiento I9 la actividad bactericida se alcanza al final del ensayo.

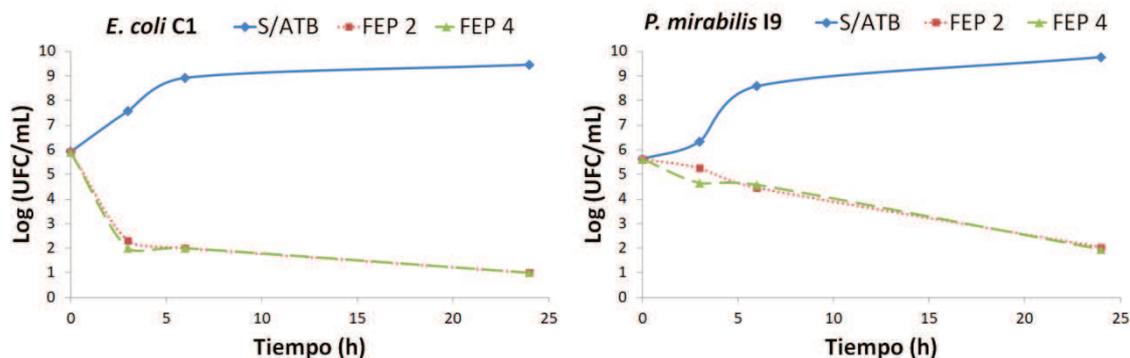


Figura 36: Curvas de cinética de muerte para los aislamientos productores de CMY-2 frente a FEP. Aislamientos evaluados: *E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9. Las líneas continuas azules indican el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo sin antibiótico, mientras que, las líneas de puntos rojos corresponden a la concentración de FEP de 2 x CIM y las verdes a 4 x CIM. Los números en la leyenda superior corresponden a la concentración de FEP evaluada en cada caso en $\mu\text{g/mL}$.

3.1.7 Aislamientos productores de CMY-2 frente a GEN

Se ensayaron curvas de cinética de muerte para 2 aislamientos productores de CMY-2 (*E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9) frente a concentraciones de GEN de 2 x CIM y 4 x CIM para cada bacteria.

En los 2 aislamientos estudiados a una concentración de antibiótico de 2 x CIM no se obtuvo efecto bactericida de GEN, observándose recrecimiento de las dos bacterias hacia el final del ensayo (Figura 37). Cuando se evaluó el antibiótico a una concentración de 4 x CIM se observó efecto bactericida sobre el aislamiento de *E. coli* C1, lo que no ocurrió en el aislamiento de *P. mirabilis* I9 que mostró recrecimiento.

En los casos donde se observó recrecimiento, este se visualiza al final del cultivo.

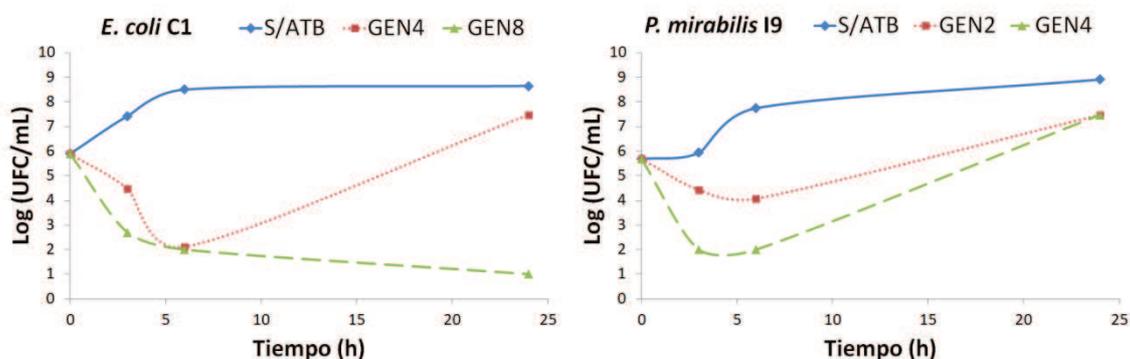


Figura 37: Curvas de cinética de muerte para los aislamientos productores de CMY-2 frente a GEN. Aislamientos evaluados: *E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9. Las líneas continuas azules indican el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo sin antibiótico, mientras que, las líneas de puntos rojos corresponden a la concentración de GEN de 2 x CIM y las verdes a 4 x CIM. Los números en la leyenda superior corresponden a la concentración de GEN evaluada en cada caso en $\mu\text{g/mL}$.

3.1.8 Transconjugantes productores de CMY-2 frente a FEP

Se ensayaron curvas de cinética de muerte para los dos transconjugantes productores de CMY-2 frente a concentraciones de FEP de 2 x CIM y 4 x CIM. Los transconjugantes usados para este ensayo fueron TC C1 y TC I9. Estos transconjugantes fueron obtenidos en ensayos de conjugación a partir de los aislamientos C1 e I9.

Se observó efecto bactericida sobre los 2 transconjugantes estudiados a las 24 h de incubación (Figura 38). Durante la primera etapa del estudio, a las 3 h de incubación, se observó la acción antimicrobiana de FEP mediante la disminución del número de bacterias viables, aunque a este tiempo no se alcanzó el efecto bactericida en ninguno de los transconjugantes a ambas concentraciones evaluadas (2 x CIM y 4 x CIM). Para las 6 h de incubación se alcanzó el efecto bactericida en los 2

transconjugantes para ambas concentraciones, el cual se acentuó hacia el final del ensayo.

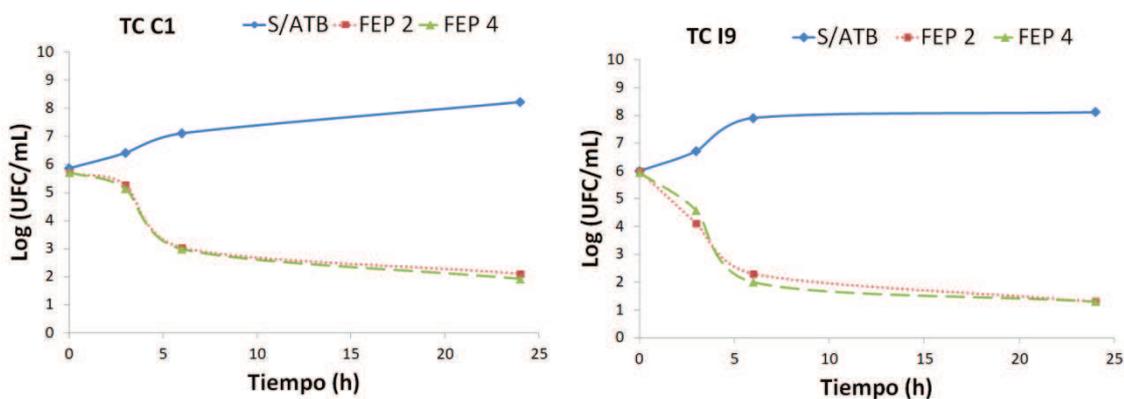


Figura 38: Curvas de cinética de muerte para los transconjugantes productores de CMY-2 frente a FEP. Transconjugantes evaluados: TC C1 y TC I9. Las líneas continuas azules indican el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo sin antibiótico, mientras que, las líneas de puntos rojos corresponden a la concentración de FEP de 2 x CIM y las verdes a 4 x CIM. Los números en la leyenda superior corresponden a la concentración de FEP evaluada en cada caso en µg/mL.

3.2 Sinergia entre ceftazidima y gentamicina

Se ensayaron curvas de cinética de muerte para los 2 aislamientos productores de CMY-2 frente a la combinación de antibióticos CAZ-GEN, los cuales se usaron a concentraciones de 2 x CIM y 4 x CIM para cada antibiótico. Los aislamientos seleccionados para este ensayo fueron *E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9, los cuales ya habían sido evaluados frente a los antibióticos en ensayos individuales. Este ensayo se utilizó para evaluar la sinergia entre ambos antibióticos.

La combinación CAZ-GEN mostró efecto bactericida sobre ambos aislamientos estudiados a las 24 h de incubación (Figura 39). En los dos aislamientos, se evidencia la actividad antimicrobiana de la combinación de antibióticos en las primeras etapas del ensayo a ambas concentraciones de antibióticos (2 x CIM y 4 x CIM).

Los resultados obtenidos usando la combinación CAZ-GEN en comparación a cuando se utilizaron los antibióticos individuales (Figuras 34 y 37) demuestran sinergia *in vitro* entre ambos antibióticos cuando se observó luego de 24 horas de incubación que el recuento se redujo en $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL en presencia de CAZ-GEN, respecto a GEN, que fue el antimicrobiano más activo. Este resultado se evidencia en forma comparativa en la figura 40 donde se observa que hay sinergia frente al aislamiento de *P. mirabilis* I9 a ambas concentraciones de antibióticos evaluadas (2 x CIM y 4 x CIM), mientras que sobre *E. coli* C1 se observa el mismo efecto a la concentración de 2 x CIM de cada antibiótico ya que a 4 x CIM no corresponde realizar esta evaluación.

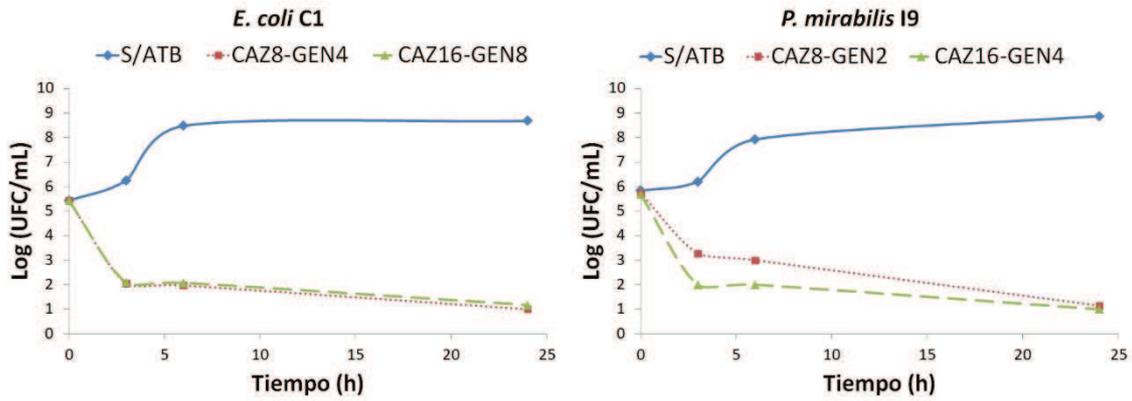


Figura 39: Curvas de cinética de muerte para los aislamientos productores de CMY-2 frente a la combinación CAZ-GEN. Aislamientos evaluados: *E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9. Las líneas continuas azules indican el comportamiento de las bacterias en el medio de cultivo sin antibiótico, mientras que, las líneas de puntos rojos corresponden a la concentración de CAZ y GEN de 2 x CIM y las verdes a 4 x CIM. Los números en la leyenda superior corresponden a las concentraciones de CAZ y GEN evaluadas en cada caso en $\mu\text{g/mL}$.

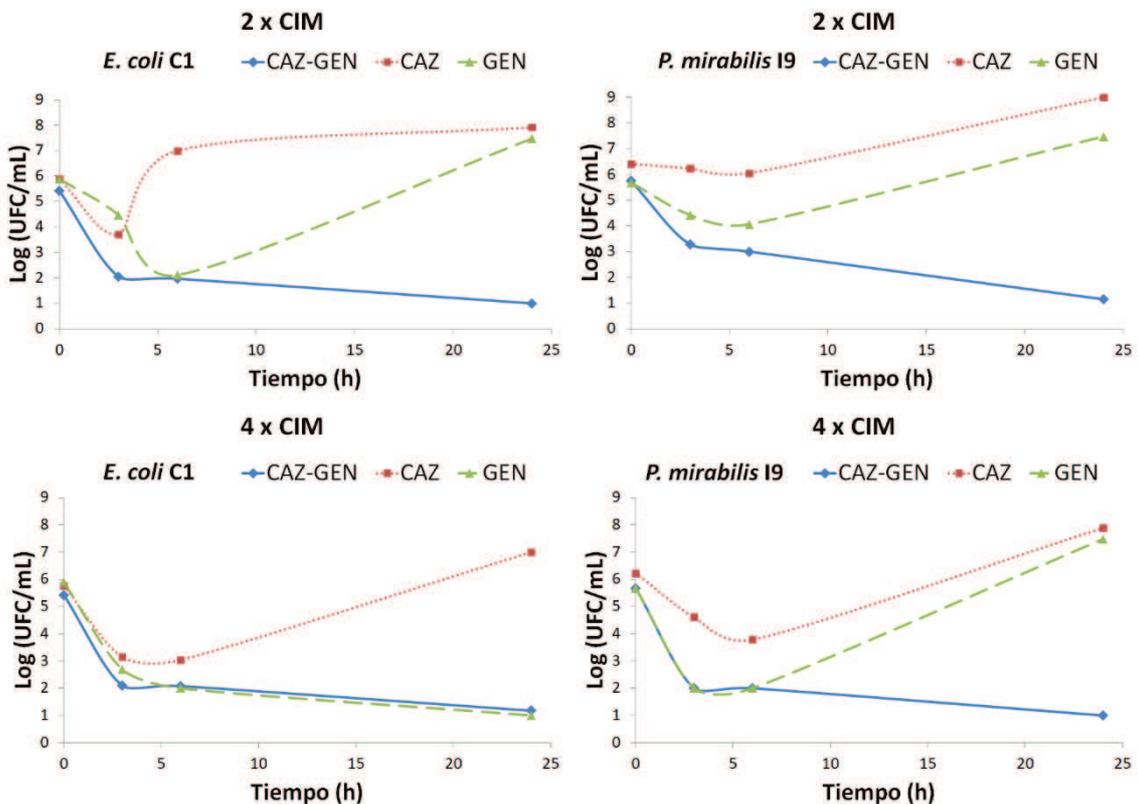


Figura 40: Curvas comparativas de cinética de muerte usadas para evaluar sinergia entre CAZ y GEN para los aislamientos *E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9. Antibióticos evaluados: CAZ, GEN y la combinación CAZ-GEN. Las líneas continuas azules indican el comportamiento de las bacterias frente a la combinación CAZ-GEN, mientras que, las líneas de puntos rojas corresponden al comportamiento de las bacterias frente a CAZ y las verdes corresponden al comportamiento de las bacterias frente a GEN. Se observa una reducción del recuento en $\geq 2 \log_{10}$ UFC/mL en presencia de CAZ-GEN, en comparación a GEN para los aislamientos C1 e I9 para concentraciones de antibióticos de 2 x CIM y para el aislamiento I9 a 4 x CIM.

DISCUSIÓN

3.1 Actividad bactericida: CAZ es activo frente a las bacterias productoras de CTX-M-2 y CTX-M-14 y FEP frente a las productoras de CMY-2

Los experimentos de cinética de muerte permitieron evaluar el comportamiento *in vitro* de los diferentes aislamientos con fenotipo de resistencia disociada a CTG frente a distintos antibióticos. Por un lado, se estudiaron 2 aislamientos productores de CTX-M-2 (*E. coli* N1 y *P. mirabilis* C13) y 2 aislamientos productores de CTX-M-14 (*E. coli* N8 y *K. pneumoniae* I26) frente a CAZ y FEP. A su vez, se evaluó el comportamiento de los transconjugantes asociados a estos aislamientos (TC N1, TC C13 y TC I26) frente a CAZ.

Por otro lado, se estudiaron 2 aislamientos productores de CMY-2 (*E. coli* C1 y *P. mirabilis* I9) frente a CAZ, CTX, FEP y GEN y los 2 transconjugantes asociados a estos aislamientos (TC C1 y TC I9) frente a FEP.

La cefalosporina CAZ mostró actividad bactericida en los aislamientos productores de CTX-M-2 y CTX-M-14 a concentraciones de 2 x CIM y 4 x CIM (Figura 31), mientras que, este antibiótico solo muestra actividad al comienzo del ensayo (en las primeras 3 h) sobre los aislamientos productores de CMY-2, los cuales a partir de ese momento mostraron recrecimiento alcanzando valores de UFC/mL ligeramente menores a los de los controles de crecimiento sin antibiótico (Figura 34). A su vez, estos aislamientos productores de CMY-2 mostraron un comportamiento semejante al observado frente a CAZ cuando se enfrentaron a CTX (Figura 35). También se observó actividad bactericida de CAZ sobre los transconjugantes productores de CTX-M-2 y CTX-M-14 (Figura 33). Estos resultados son consistentes con el hecho de que las enzimas CTX-M-2 y CTX-M-14 son consideradas “cefotaximasas” que muestran mayor capacidad de hidrólisis y afinidad por CTX con respecto a CAZ, mientras que, por el contrario CMY-2 podría tener buena actividad sobre ambas CTG mostrando un perfil más homogéneo de hidrólisis (Gutkind et al., 2013). De esta manera, resulta insuficiente contar con los valores de CIM o la interpretación del antibiograma para CAZ de los aislamientos con fenotipo de resistencia disociada a CTG, sino, que también es importante reconocer los mecanismos de resistencia implicados en producir los fenotipos observados de manera tal de definir una potencial terapia antibiótica usando antibióticos β -lactámicos.

Cuando el antibiótico evaluado fue FEP se observó un comportamiento totalmente opuesto sobre este mismo grupo de aislamientos. En el caso de los aislamientos productores de BLEE (CTX-M-2 y CTX-M-14) FEP no mostró acción

bactericida obteniéndose recrecimiento en los 4 casos evaluados (Figura 32). En cambio, sobre los aislamientos productores de CMY-2 y sus transconjugantes, FEP mostró actividad bactericida (Figuras 36 y 38). Estos resultados son consistentes con lo descrito con respecto a las diferentes actividades hidrolítica hacia FEP mostrada por las enzimas CTX-M y CMY-2 (Gutkind et al., 2013). Las enzimas CTX-M muestran una elevada afinidad por FEP similar a la que se observa por CTX, e incluso, algunas variantes CTX-M muestran mayor afinidad por FEP que por CAZ, en contraste, las enzimas AmpC presentan mucho menor afinidad por FEP en comparación con las CTG (Endimiani et al., 2008). Este hecho se respalda en aislamientos productores de enzimas CTX-M, aun cuando muestren valores de CIM en el rango de sensibilidad o dependiente de la dosis, ya que FEP no fue activo *in vitro* en este estudio.

Al evaluar GEN como antibiótico frente a los aislamientos productores de CMY-2, se observó que en *E. coli* C1 este aminoglucósido ejerció efecto bactericida a una concentración de 4 x CIM, mientras que a 2 x CIM no fue lo suficientemente activo mostrando recrecimiento luego de 24 h de cultivo, en cambio, el aislamiento de *P. mirabilis* I9 mostró recrecimiento a ambas concentraciones de GEN (Figura 37). El antibiótico GEN es el aminoglucósido más utilizado debido a su bajo costo y su confiable actividad contra aerobios gram negativos. Sin embargo, para su utilización en tratamientos empíricos deben evaluarse los patrones de resistencia locales (Pai et al., 2004). GEN es una alternativa importante en el tratamiento de enterobacterias productoras de BLEE y AmpC cuando es confirmada su sensibilidad, lo que permite resguardar el uso de antimicrobianos críticos, principalmente en aislamiento que no presentan fenotipo de resistencia disociada a CTG, sin embargo, no es recomendable el uso empírico de aminoglucósidos ante la sospecha de aislamientos multiresistentes (Hawkey et al., 2018; Rodríguez-Bano et al., 2018).

3.2 Se observa sinergia entre CAZ y GEN frente a bacterias productoras de CMY-2

Las CTG pueden estar indicadas como terapia empírica en combinación con otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos, quinolonas o inhibidores clásicos de β -lactamasas para infecciones del tracto genitourinario, infecciones de huesos y articulaciones, neumonía adquirida en la comunidad, infecciones de piel y tejidos blandos y para infecciones del sistema nervioso central, como meningitis (Arumugham & Cascella, 2020). Ante esta alternativa terapéutica, se evaluó la combinación de CAZ y GEN frente a los aislamientos productores de CMY-2 con fenotipo de resistencia disociada a CTG.

La combinación de antimicrobianos CAZ y GEN (en las concentraciones evaluadas) tuvieron actividad bactericida sobre ambos aislamientos productores de CMY-2 y se observó un efecto sinérgico *in vitro* (Figuras 39 y 40). Previamente, ya había sido demostrada la mejora en la actividad bactericida *in vitro* al combinar CTG y aminoglucósidos sobre *Enterobacterales* (Bayer et al., 1984). Se ha observado que la combinación de antibióticos activos sobre la pared celular (como los β -lactámicos) y aminoglucósidos aumentan la acumulación intracelular de estos últimos, de manera tal que pueden alcanzar concentraciones intracelulares más altas y de esta manera ejercer su acción más eficientemente inhibiendo la síntesis de proteínas (Gilbert & Leggett, 2012), lo cual explica en parte la sinergia observada en este estudio.

3.3 Alternativas terapéuticas para *Enterobacterales* con fenotipo disociado

Los *Enterobacterales* productores de BLEE y AmpC se asocian a un incremento en la duración de la estancia de internación, en los gastos asociados al tratamiento y en la mortalidad de pacientes infectados (Hawkey et al., 2018). La mejor alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por este grupo de bacterias son los carbapenemes (Hawkey et al., 2018; Rodriguez-Bano et al., 2018). Sin embargo, el incremento en la prevalencia de aislamientos productores de BLEE principalmente y AmpC llevó a aumentar el uso de estos antibióticos de reserva, con el consiguiente incremento en la resistencia a carbapenemes (Codjoe & Donkor, 2017; Patel & Bonomo, 2013). Esta situación obliga a evaluar la utilización de fármacos alternativos para el tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacterales* productores de enzimas BLEE y AmpC.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran a CAZ como un antibiótico activo *in vitro* frente a enterobacterias con fenotipo de resistencia disociada a CTG productoras de enzimas CTX-M-2 y CTX-M-14. Resultados semejantes fueron observados en otro estudio (Kang et al., 2014) donde CAZ mostró una actividad *in vitro* semejante a los carbapenemes sobre aislamientos de *E. coli* productores de CTX-M. Cabe destacar que estos aislamientos fueron mayormente productores de CTX-M-14, donde se destaca una alta prevalencia de resistencia disociada a CTG. A su vez, la actividad de CAZ se encontró marcadamente afectada por “efecto inóculo”. Sin embargo, a pesar de estos resultados en favor del uso de CAZ en el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de CTX-M con fenotipo de resistencia disociada, no se dispone de estudios *in vivo* que avalen a este antibiótico como alternativa terapéutica, a su vez su uso es desaconsejado en diferentes publicaciones (Hawkey et al., 2018; Kang et al., 2014; Rodriguez-Bano et al., 2018),

aunque en las mismas no se tiene en cuenta contextos epidemiológicos donde se presentan aislamientos CTX^R y CAZ^S.

En consonancia con lo observado en este estudio es totalmente desaconsejado el uso de CAZ en monoterapia para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de enzimas AmpC (Choi et al., 2008; Hawkey et al., 2018).

En los aislamientos productores de CTX-M FEP no fue activo, mientras que en aquellos productores de CMY-2 esta cefalosporina mostró actividad bactericida. FEP es un antimicrobiano de amplio espectro que puede penetrar y alcanzar al líquido cefalorraquídeo y tiene la capacidad de atravesar más eficientemente la membrana externa de las bacterias gram negativas en comparación con otras cefalosporinas. Aunque es eficaz contra bacterias gram positivas y gram negativas, FEP se reserva para infecciones sistémicas graves en pacientes que probablemente tengan organismos multiresistentes (Bui & Preuss, 2020). Algunos autores han indicado que solamente se puede observar un efecto bactericida de FEP, usando ensayos de cinética de muerte, sobre aislamientos productores de BLEE cuando se utiliza en combinación con inhibidores de β -lactamasas (Garcia-Hernandez et al., 2011). De cualquier modo, toda esta información debe ser tomada con precaución debido a que en principio y por el momento no tiene una traducción clínica práctica hasta contar con resultados *in vivo* confiables. Por otro lado, Lee et al. (2013) han observado que en bacteriemias causadas por enterobacterias productoras de BLEE hubo un mayor porcentaje de mortalidad y fracaso terapéutico en los pacientes que recibieron FEP como tratamiento en comparación a la terapia con carbapenemes. Sin embargo, estos autores, proponen a FEP como droga parenteral para infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE que son sensibles a este β -lactámico según los puntos de corte del CLSI y presenten valores de CIM ≤ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En este estudio, los aislamientos productores de BLEE que presentaron un valor de CIM = 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a FEP (C13 y N8) mostraron recrecimiento *in vitro*, descartando esta alternativa.

En contraste, en otro estudio (Tamma et al., 2013) se demostró que pacientes con infecciones causadas por enterobacterias productoras de AmpC cromosómicas inducibles mostraron buenos resultados al ser tratados con FEP, con valores de mortalidad y duración de la internación muy semejantes a los obtenidos usando meropenem en el tratamiento. Esta observación concuerda con el hecho de que FEP es más estable frente a enzimas AmpC en comparación a lo que ocurre con las BLEE (Gutkind et al., 2013). Sin embargo, se han observado mutaciones en la enzima AmpC de *E. cloacae* que generan resistencia a esta cefalosporina (Hawkey et al., 2018). A su

vez, la emergencia de aislamientos que expresan BLEE y AmpC es motivo de preocupación y en estos casos no es recomendable el tratamiento de estas infecciones utilizando FEP (Hawkey et al., 2018) o combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas (Dashti et al., 2014).

Es importante destacar que los aislamientos evaluados mediante curvas de cinética de muerte fueron obtenidos de muestras de orina, donde por lo general las cefalosporinas son capaces de alcanzar altas concentraciones intratratamiento lo que permitiría obtener concentraciones de CAZ semejantes a las utilizadas en los ensayos de curvas de cinética de muerte para los aislamientos productores de CTX-M (Richards & Brogden, 1985) y de FEP para los ensayos realizados sobre los aislamientos productores de CMY-2 (Barradell & Bryson, 1994).

Ante situaciones donde se considera que el uso de β -lactámicos como monoterapia no es apropiado, se recomienda la combinación de antibióticos, siendo las cefalosporinas y los aminoglucósidos una posibilidad de terapia combinada (Serisier et al., 2012).

El estudio realizado en este trabajo muestra efecto sinérgico *in vitro* al combinar CAZ con GEN frente a 2 aislamientos de *Enterobacterales* productores de CMY-2 con fenotipo de resistencia disociada a CTG.

Si bien se ha demostrado *in vitro* la acción sinérgica entre los β -lactámicos y los aminoglucósidos, la evidencia clínica que respalda estos datos es escasa y conflictiva (Bayer et al., 1984; Tamma et al., 2012). Por ejemplo, en un estudio realizado en 200 pacientes con bacteriemias causadas por *P. aeruginosa* no se encontró una correlación significativa entre los resultados de sinergia obtenidos *in vitro* con los resultados clínicos (Hilf et al., 1989). En línea con estos resultados, Chandrasekar et al. (1987) no encontraron evidencia clínica de una mayor probabilidad de efectividad clínica en pacientes tratados con un β -lactámico y un aminoglucósido, independientemente de las pruebas *in vitro* favorables.

Por el contrario, en un estudio retrospectivo de 444 casos de bacteriemias causadas por bacterias gram negativas (Bodey et al., 1991), se observó una respuesta clínica favorable del 80% en aquellos pacientes que recibieron terapia combinada, mientras que la respuesta de los pacientes tratados con monoterapia fue de 64%. En este caso, el sinergismo obtenido *in vitro* se correlacionó con mejores respuestas clínicas. Resultados semejantes fueron observados en otro estudio (De Jongh et al., 1986), donde se concluye que las terapias combinadas pueden ser indicadas en pacientes neutropénicos con bacteriemias causadas por bacterias gram negativas.

Si bien los estudios de combinaciones de aminoglucósidos y β -lactámicos presentan resultados dispares en cuanto a la efectividad clínica de este tipo de terapias, todavía pueden considerarse una opción para el cuidado de los carbapenemes en regiones donde circulan las enzimas BLEE o las β -lactamasas AmpC que otorguen fenotipo disociado, en particular en las infecciones urinarias y las sepsis (Rodríguez-Bano et al., 2018).

En síntesis, el uso de CAZ como fármaco terapéutico podría ser una alternativa viable para tratar las infecciones causadas por aislamientos productores de CTX-M con fenotipo de resistencia disociada a CTG. A su vez, a pesar del reducido número de aislamientos estudiados, podría sugerirse el uso de FEP o CAZ combinado con GEN para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias productoras de CMY-2 con este fenotipo.

Estos hallazgos enfatizan la importancia de informar el perfil de sensibilidad sin extrapolar la resistencia de una CTG al resto (interpretar el perfil) y de caracterizar los mecanismos de resistencia involucrados en *Enterobacterales* con fenotipo de resistencia disociada a CTG (BLEE vs. AmpCp) antes de definir los tratamientos antibióticos. Por tanto, es importante revalorizar la información que aporta el perfil de sensibilidad inicial que orienta en cuanto a la presencia de estos mecanismos, el cual puede ser fácilmente obtenido independientemente del grado de complejidad del laboratorio encargado del análisis, mediante técnicas de difusión por discos o utilizando equipamiento automatizado.

3.4 Propuesta de informe en el laboratorio de microbiología

De acuerdo a los resultados alcanzados en este trabajo donde se estudiaron aislamientos de *Enterobacterales* con fenotipo de resistencia disociado a CTG presumiblemente causado por diferentes β -lactamasas, resulta de suma importancia el estudio de cada aislamiento y no adoptar posturas extremas en el informe de los perfiles de sensibilidad independizándose del mecanismo causal. Es decir, no es necesario informar todas las CTG resistentes ante un aislamiento CTX^R, ni informar solo el perfil de sensibilidad sin la búsqueda del mecanismo responsable ante un fenotipo disociado. Resulta importante tener esta consideración en el perfil de sensibilidad a las CTG en aislamientos de *E. coli* y *P. mirabilis* y sumar aquí la caracterización del mecanismo enzimático presente para definir un tratamiento dirigido, dándole la posibilidad a drogas diferentes de los antibióticos de importancia crítica como los carbapenemes, un recurso terapéutico que se debe cuidar.

En base a estas consideraciones y a los datos epidemiológicos de *Enterobacterales* con resistencia a CTG, la caracterización de los mecanismos involucrados en el fenotipo disociado y la respuesta de los aislamientos (mediante curvas de letalidad) a diferentes opciones terapéuticas; se propone el siguiente esquema de análisis trabajo:

Para el caso de *Enterobacterales* con CTG^R y sensibilidad a carbapenemes (focalizados en β-lactámicos) se propone que:

- 1- Para aislamientos CTX^R y CAZ^R (independientemente del resultado de sensibilidad de FOX y FEP): informar el resultado de sensibilidad solo a carbapenemes.
- 2- Para aislamientos CTX^R y CAZ^S: tener presente la especie bacteriana; si corresponde a *E. coli* o *P. mirabilis*, continuar con item 3, si la especie es *K. pneumoniae* u otra enterobacteria, idem al item 1.
- 3- a) Para aislamientos FOX^R y FEP^S: sospecha de AmpCp (se puede ensayar sinergia entre APB y CTG), informar CAZ^R y FEP^S. Si el aislamiento es GEN^S se puede sugerir combinación con CAZ.
b) Para aislamientos FOX^S y FEP^R (AZT^R): sospecha de BLEE (se puede confirmar según ensayo fenotípico del CLSI), informar CAZ^S y FEP^R.

CAPÍTULO 4

Análisis de genomas bacterianos

CAPÍTULO 4: Análisis de genomas bacterianos**INTRODUCCIÓN**

4.1 Secuenciación de nueva generación

Los grandes avances tecnológicos en los últimos años han conducido al desarrollo de la secuenciación de nueva generación o *next generation sequencing* (NGS), también conocida como secuenciación masiva paralela, del inglés *massive parallel sequencing* (MPS). Esta “nueva generación” ha mejorado rápidamente, posibilitando que el número de bases que se pueden secuenciar por unidad de tiempo haya crecido exponencialmente, obteniéndose resultados en cortos periodos a costos mucho más accesibles que las tecnologías de primera generación (Goodwin et al., 2016).

La NGS tiene el potencial de detectar todos los tipos de variaciones genómicas en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales como inversiones, translocaciones, deleciones o duplicaciones (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

La NGS implica la fragmentación de ADN y mediante ligación se añaden secuencias adaptadas o adaptadores (secuencias conocidas) a los extremos. Los fragmentos de ADN a continuación se amplifican clonalmente y se agrupan juntos (*clustering*) para ser utilizados como entidades a secuenciar. La secuenciación se realiza entonces alternando ciclos de terminación reversible cíclica (CRT) y de toma de imágenes (*imaging*) (Metzker, 2010). La reacción CRT utiliza terminadores reversibles para incorporar nucleótidos marcados fluorescentemente que a continuación son “fotografiados” en la toma de imágenes y posteriormente son procesados. Las secuencias cortas producidas por el equipo a partir de los extremos del ADN con los adaptadores se denominan lecturas o *reads*. En general, los nuevos secuenciadores generan lecturas a partir de cada uno de los extremos de un fragmento de ADN (el inserto), dando lugar a lecturas apareadas, y lo hacen usando dos estrategias diferentes. Los *mate pairs* se crean a partir de fragmentos de ADN de tamaño conocido (creando librerías con tamaños de inserto entre 600 pb hasta 4 kb), que se circularizan y se ligan usando un adaptador interno. Estos fragmentos circularizados se cortan al azar para luego purificar los segmentos que contienen el adaptador a partir del que se secuencian. Por el contrario, las lecturas de tipo *paired end* se generan mediante la fragmentación del ADN en pequeños segmentos (< 300 pb) de

los cuales se secuencian el final de ambos extremos (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012). Las lecturas *paired end* proporcionan rangos de tamaños de inserto más cortos, mientras que las de tipo *mate pair* tienen la ventaja de cubrir tamaños mayores (Fullwood et al., 2009; Medvedev et al., 2009). Un aspecto importante en la NGS es el número de veces que cada base del genoma está presente en los *reads* de secuenciación producidos. Este valor se denomina profundidad de cobertura (*depth of coverage*, o simplemente, *coverage*) y es uno de los factores determinantes para evaluar la fiabilidad del nucleótido asignado a esa posición del genoma (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

Existen diferentes tecnologías de NGS utilizadas a nivel mundial y en diversos proyectos científicos (454 *GSFlex*, *HiSeq* y *SOLiD*). En el último tiempo han aparecido versiones de equipos de NGS con características más limitadas en cuanto a su rendimiento y capacidad de secuenciación pero con mayor facilidad de manejo, tales como *MiSeq Personal Sequencer* de Illumina (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

La tecnología *MiSeq* utiliza la secuenciación por síntesis de terminación reversible para proporcionar soluciones de secuenciación de extremo a extremo (*end-to-end*). Permite la amplificación y la secuenciación de ADN genómico. Realiza ejecuciones *single-* o *paired-end* con longitudes de *read* ajustables desde 1 x 36 pb a 2 x 300 pb. Una sola ejecución puede producir datos de salida de hasta 15 Gb en tan solo 4 h de tiempo de ejecución y puede generar hasta 25 M de *single-read* y 50 M de *paired-end* (Ravi et al., 2018).

Una parte muy importante en el esquema de trabajo de un experimento de NGS es el análisis computacional de la información generada. La NGS produce una cantidad de información sin precedentes que ordenadores comunes no pueden manejar y cualquier tarea no trivial requerirá al menos de una persona con conocimientos en bioinformática (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

4.2 Bioinformática

La gran cantidad de información que se ha generado en la última década con las nuevas tecnologías de análisis señala los desafíos que deben superarse para el almacenamiento y el procesamiento de la información biológica. En este contexto, la bioinformática y la biología computacional han buscado superar tales desafíos. De esta manera la era de una “nueva biología” depende del desarrollo de estas áreas. En los últimos años, la bioinformática y la genómica han evolucionado de manera interdependiente y han promovido un impacto histórico en el conocimiento disponible (Diniz & Canduri, 2017).

Debido al carácter multidisciplinario de la bioinformática, esta se puede definir como la aplicación de herramientas computacionales para organizar, analizar, comprender, visualizar y almacenar información asociada a macromoléculas biológicas (Luscombe et al., 2001; Pevsner, 2015).

Los objetivos de la bioinformática y la genómica vistos desde un punto de vista computacional son: i) organizar los datos para que los investigadores puedan acceder a la información y crear nuevas entradas; ii) desarrollar herramientas y recursos que ayuden en el análisis de datos; y iii) utilizar estas herramientas para analizar los datos e interpretarlos de manera significativa (Luscombe et al., 2001).

Los datos crudos generados a partir de NGS deben ser procesados y evaluados en cuanto a su calidad. El procesamiento implica el ensamblado que permite obtener las secuencias completas (genómicas, plasmídicas, etc.) y la búsqueda de las diferentes regiones codificantes presentes, proceso conocido como “anotación”.

4.3 Calidad de secuencias crudas o lecturas

Las secuencias crudas obtenidas a partir de la NGS deben ser evaluadas en cuanto a su calidad antes de continuar con el ensamblado de las mismas. La herramienta que permite este análisis de calidad es FastQC disponible en la plataforma *BaseSpace*® de Illumina (<https://basespace.illumina.com/>). Este programa facilita el análisis de calidad de archivos FASTQ y puede reportar una amplia gama de información relacionada con el perfil de calidad de las lecturas. El análisis extrae información clave, en particular el número de lecturas y la duración promedio de la lectura con un puntaje de calidad de 30 o superior y produce un resumen que contiene todos los gráficos principales de FastQC (Leggett et al., 2013). FastQC proporciona un conjunto modular y organizado de análisis que se puede utilizar para dar una impresión rápida acerca de si los datos tienen algún problema que se deba tener en cuenta antes de realizar un análisis adicional (Babraham Bioinformatics, s.f.). El resumen resaltará en rojo cualquier muestra cuya calidad o rendimiento sea menor que el mínimo esperado. De particular interés son los gráficos de calidad base por base (*Per Base Sequence Quality*), que pueden resaltar rápidamente los problemas y permite anexar un procesamiento adicional (como el recorte) o planificar la reprogramación de las secuenciación (Leggett et al., 2013).

El análisis de FastQC (Babraham Bioinformatics, s.f.) consiste en los siguientes campos:

- Estadísticas básicas (*Basic Statistics*).

Este módulo genera algunas estadísticas de composición simples para los archivos analizado, sin embargo, nunca genera advertencias ni errores.

- Calidad base por base (*Per Base Sequence Quality*).

En este módulo se muestra gráficamente una descripción general del rango de valores de calidad en todas las bases en cada posición en el archivo FASTQ. Probablemente sea el parámetro más relevante para evaluar la calidad de una secuencia. Para cada posición se dibuja un diagrama de caja, donde los elementos son los siguientes: la línea roja central representa el valor mediano, el cuadro amarillo representa el rango intercuartílico (25-75%), los valores extremos superior e inferior representan los puntos del 10% y el 90% y la línea azul representa la calidad media. El eje “y” del gráfico muestra los puntajes de calidad. Cuanto mayor sea la puntuación, mejor será la llamada de base. El fondo del gráfico divide el eje y en llamadas de muy buena calidad (verde), llamadas de calidad razonable (naranja) y llamadas de mala calidad (rojo) (Figura 41). Es común ver que las llamadas de base caen en el área naranja hacia el final de una lectura.

Se emitirá una advertencia si el cuartil inferior de cualquier base es menor que 10, o si la mediana de cualquier base es menor que 25.

Este módulo generará una falla si el cuartil inferior de cualquier base es menor que 5 o si la mediana de cualquier base es menor que 20.

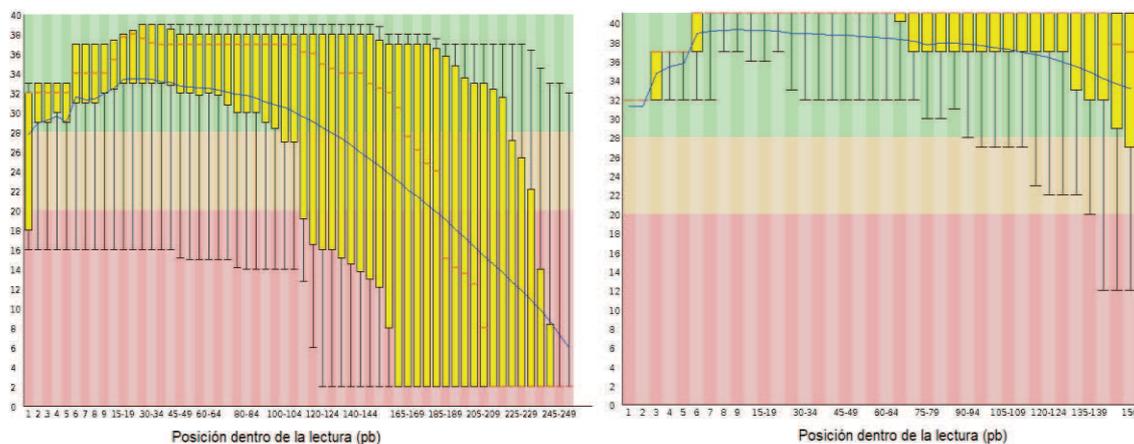


Figura 41: Gráficos de análisis de calidad base por base. Izquierda: Gráfico que representa mala calidad de las lecturas obtenidas en la secuenciación. Derecha: Gráfico que representa lecturas de buena calidad. Imagen modificada de FastQC Tutorial & FAQ (s.f.).

- Puntajes de calidad por secuencia (*Per Sequence Quality Scores*).

Permite ver si un subconjunto de secuencias tiene valores de calidad bajos. A menudo ocurre que un subconjunto de secuencias tiene una calidad universalmente baja, sin embargo, estas deben representar solo un pequeño porcentaje del total de

secuencias. Si una proporción significativa de las secuencias en una ejecución tiene una calidad baja en general, esto podría indicar algún tipo de problema sistemático.

Se genera una advertencia si la calidad media observada con mayor frecuencia es inferior a 27, lo que equivale a una tasa de error del 0,2%, y se indica falla si la calidad media observada con mayor frecuencia es inferior a 20; esto equivale a una tasa de error del 1%.

- Contenido de secuencia por base (*Per Base Sequence Content*).

Este módulo traza la proporción en cada posición de base en un archivo para el que se ha llamado a cada una de las cuatro bases de ADN normales.

En una biblioteca aleatoria, se esperaría que hubiera poca o ninguna diferencia entre las diferentes bases de una secuencia de ejecución, por lo que las líneas en este gráfico deben correr paralelas entre sí.

Este módulo emite una advertencia si la diferencia entre A y T, o G y C es superior al 10% en cualquier posición y, se indicará como falla si la diferencia entre A y T, o G y C es mayor al 20% en cualquier posición.

- Contenido de CG por secuencia (*Per Sequence GC Content*).

Este módulo mide el contenido de GC en toda la longitud de cada secuencia y lo compara con una distribución normal modelada de contenido de GC. En una biblioteca aleatoria normal, esperaría ver una distribución aproximadamente normal del contenido de GC donde el pico central corresponde al contenido general de GC del genoma subyacente.

Una distribución de forma inusual podría indicar una biblioteca contaminada o algún otro tipo de subconjunto sesgado. Una distribución normal que se desplaza indica algún sesgo sistemático que es independiente de la posición base.

Se genera una advertencia si la suma de las desviaciones de la distribución normal representa más del 15% de las lecturas y, se indicará una falla si la suma de las desviaciones de la distribución normal representa más del 30% de las lecturas.

- Contenido de N por base (*Per Base N Content*).

Si un secuenciador no puede realizar una llamada de base con suficiente confianza, normalmente sustituirá una base convencional por la llamada "N". Este módulo traza el porcentaje de llamadas de base en cada posición para la que se solicitó una N. Si esta proporción se eleva por encima de un pequeño porcentaje, sugiere que el proceso de análisis no pudo interpretar los datos lo suficientemente bien como para realizar llamadas de base válidas.

Este módulo genera una advertencia si alguna posición muestra un contenido de N > 5% y, dará error si alguna posición muestra un contenido de N > 20%.

- Distribución de la longitud de secuencias (*Sequence Length Distribution*).

Este módulo genera un gráfico que muestra la distribución de tamaños de fragmentos en el archivo que fue analizado y producirá una advertencia si todas las secuencias no tienen la misma longitud y, producirá un error si alguna de las secuencias tiene una longitud cero.

- Secuencias duplicadas (*Duplicate Sequences*).

En una biblioteca diversa, la mayoría de las secuencias se producirán solo una vez en el conjunto final. Un nivel bajo de duplicación puede indicar un nivel muy alto de cobertura de la secuencia diana, pero es más probable que un nivel alto de duplicación indique algún tipo de sesgo de enriquecimiento. En una biblioteca adecuadamente diversa, la mayoría de las secuencias deberían ubicarse en el extremo izquierdo del gráfico. Un nivel general de enriquecimiento, que indica una amplia secuenciación excesiva en la biblioteca, tenderá a aplanar las líneas, reducir el nivel bajo y, en general, elevar otras categorías.

Este módulo emitirá una advertencia si las secuencias no únicas constituyen más del 20% del total y, se producirá error si estas secuencias alcanzan más del 50% del total.

- Secuencias sobrerrepresentadas (*Overrepresented Sequences*).

Una biblioteca normal de alto rendimiento contendrá un conjunto diverso de secuencias, sin que ninguna secuencia individual constituya una pequeña fracción del total. Descubrir que una sola secuencia está muy sobrerrepresentada en el conjunto significa que es muy importante desde el punto de vista biológico o indica que la biblioteca está contaminada o no es tan diversa como esperaba.

Este módulo enumera todas las secuencias que constituyen más del 0,1% del total y emitirá una advertencia si se encuentra que alguna secuencia representa más del 0.1% del total y, producirá un error si se encuentra que alguna secuencia representa más del 1% del total.

- Contenido de *Kmer* (*Kmer Content*).

El análisis de secuencias sobrerrepresentadas detectará un aumento en cualquier secuencia exactamente duplicada, pero hay un subconjunto diferente de problemas en los que no funcionará:

- Ante secuencias muy largas con una calidad de secuencia deficiente, los errores de secuenciación aleatorios reducirán drásticamente los recuentos de secuencias exactamente duplicadas.

- Ante una secuencia parcial que aparece en una variedad de lugares dentro de su secuencia, esto no se verá ni en la gráfica de contenido por base ni en el análisis de secuencia duplicada.

El módulo de *Kmer* parte de la suposición de que cualquier pequeño fragmento de secuencia no debería tener un sesgo posicional en su aparición dentro de una biblioteca diversa. Por lo tanto, este módulo mide el número de cada *Kmer* en cada posición de la biblioteca y luego utiliza una prueba binomial para buscar desviaciones significativas de una cobertura uniforme en todas las posiciones. Se informa de cualquier *Kmer* con enriquecimiento posicionalmente sesgado. Los 6 principales *Kmer* más sesgados también se representan para mostrar su distribución.

Para permitir que este módulo se ejecute en un tiempo razonable, solo se analiza el 2% de toda la biblioteca y los resultados se extrapolan al resto de la biblioteca.

Este módulo emitirá una advertencia si algún *kmer* está desequilibrado con un valor p binomial <0.01 y, producirá error si alguna de estas secuencias está desequilibrada con un valor p binomial $<10^{-5}$.

4.4 Ensamblado de lecturas

Para dar sentido a los millones de pares de bases secuenciados por las NGS, es necesario ensamblar las secuencias. El ensamblado o ensamblaje consiste en una estructura de jerarquía de datos que mapea las secuencias a una supuesta reconstrucción del objetivo (Miller et al., 2010). Cuando se secuencia un genoma, se pueden adoptar dos enfoques: 1) si el genoma de la especie se ensambló previamente se realiza el mapeo con el genoma de referencia, o 2) si no se ha caracterizado un genoma previamente, se realiza ensamblaje *de novo* (Pevsner, 2015).

El ensamblaje de cada una de las lecturas se mapea entre sí en la búsqueda de identidad o regiones superpuestas para construir fragmentos contiguos que corresponden a la superposición de dos o más lecturas. Los *supercontigs*, también llamados *scaffolds*, definen el orden, la orientación y los tamaños de los espacios entre los *contigs* (Diniz & Canduri, 2017).

La calidad del montaje se evalúa mediante algunos índices, como la cobertura que hace referencia al número de lecturas asociadas con un fragmento de ADN particular. Por ejemplo, N50 se define como el número L más grande, de modo que la longitud combinada de todos los *contigs* de longitud $\geq L$ es al menos el 50% de la longitud total de todos los *contigs* (Narzisi & Mishra, 2011). El N50 revela qué parte del genoma está cubierto por *contigs* grandes (Diniz & Canduri, 2017). Otra métrica de

calidad habitualmente utilizada es el L50, que se define como el recuento del menor número de *contigs* cuya suma de longitudes constituye la mitad del tamaño del genoma (Pan et al., 2018).

El proceso de ensamblado de las lecturas generadas durante la NGS produce nodos o *contigs* que en su conjunto representan el genoma completo de los aislamientos estudiados, lo que incluye cromosoma y elementos extracromosómicos.

En el proceso de ensamblado se unen las lecturas para formar secuencias contiguas (denominadas como *contigs*) que comparten las mismas secuencias nucleotídicas según el ADN plantilla de donde derivaron las secuencias (Paszkiwicz & Studholme, 2010).

4.5 Anotación de secuencias

La anotación o caracterización funcional de un genoma implica identificar las regiones de este que posiblemente codifican para distintos tipos de ARN, es decir, la extracción de la información biológica contenida en las secuencias (Diniz & Canduri, 2017). Este proceso se lleva a cabo mediante el uso de algoritmos específicos, que en términos generales son llamados *gene callers* (Stanke & Morgenstern, 2005).

Se han desarrollado diferentes estrategias para buscar genes en genomas debido principalmente a las diferencias entre procariontes y eucariontes. En el primer paso, el trabajo consiste en identificar genes basándose en la similitud de secuencia. A continuación, se anota la función del gen comparándola con bases de datos de proteínas, como NCBI y *UniProt*. También se realiza la anotación funcional, que consiste en relacionar genes con procesos biológicos a través de términos de ontología genética. Estos términos describen la función de los genes en tres clases: función molecular, procesos biológicos y componentes celulares (Diniz & Canduri, 2017).

La anotación *de novo* del genoma bacteriano, es decir, la búsqueda de marcos abiertos de lectura (ORF del inglés *Open Reading Frames*) o secuencias codificantes (CDS del inglés *Coding Sequence*) se puede llevar a cabo cargando el ensamblado de los genomas en la herramienta automatizada en línea *Rapid Annotations using Subsystems Technology* (RAST) (Aziz et al., 2008). RAST toma como entrada los *contigs* ordenados en formato multi-FASTA, identifica a los ORF que posiblemente son genes y utiliza una serie de técnicas de subsistema para compararlos con una base de datos sofisticada de genes y secuencias de ARN, produciendo una anotación de alta calidad del ensamblaje.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

- Realizar las secuenciaciones de los genomas completos de los aislamientos *E. coli* N1 y *S. enterica* serovar Typhimurium 97.
- Obtener el ensamblado de las secuencias crudas generadas por NGS para cada aislamiento.
- Realizar la anotación de los genomas completos de *E. coli* N1 y *S. enterica* serovar Typhimurium 97.
- Caracterizar los resistomas y movilomas de los aislamientos secuenciados.
- Obtener las secuencias plasmídicas portadoras de los genes *bla*_{CTX-M-2} (*E. coli* N1) y *bla*_{CTX-M-14} (*S. Typhimurium* 97).
- Realizar la comparación de los plásmidos obtenidos con secuencias alojadas en bases de datos públicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Secuenciación de genomas completos

Se seleccionaron 2 de los aislamientos clínicos estudiados y caracterizados previamente, a los cuales se les realizó secuenciación de genoma completo utilizando tecnología NGS y la metodología *MiSeq* de Illumina (Realizado en colaboración con el Dr. Nilton Lincopan de la Universidad de San Pablo). El primer aislamiento seleccionado es el de *E. coli* productor de CTX-M-2 (cepa N1) que mostró fenotipo de resistencia disociada a CTG aislado de una muestra de orina y otro de *S. entérica* serovar Typhimurium productor de CTX-M-14 (cepa 97). Además, *S. Typhimurium* 97 corresponde a uno de los aislamientos del brote intrahospitalario analizado en el capítulo 1, aislado de sangre. Ambos aislamientos fueron seleccionados por poseer BLEE asociadas al fenotipo de resistencia disociada a CTG (ver capítulo 2).

La extracción de ADN total se realizó con el *kit* de extracción *PureLink™ Quick Gel* (Life Technologies, EE.UU.) y se prepararon las bibliotecas genómicas con el *kit* de preparación de bibliotecas de ADN *Nextera XT* (Illumina, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los aislamientos *E. coli* N1 y *S. Typhimurium* 97 se secuenciaron completamente con la plataforma NextSeq *Paired-end* PE de Illumina (75pb).

La cobertura promedio (CP) se calculó a partir del tamaño estimado del genoma (G), el número de lecturas (N) y la longitud de lectura promedio (L). De esta manera, se efectuó $CP = N \times L / G$ (Sims et al., 2014). Este valor estimó la cantidad de veces que fue secuenciada una región cualquiera del genoma, cuando mayor es su valor más veces solapó una secuencia lo que nos da un nivel mayor de confianza (Diniz & Canduri, 2017).

4.2 Bioinformática

4.2.1 Análisis de calidad de las secuencias (Pre-procesamiento)

Se realizó el análisis de calidad de las secuencias obtenidas en la NGS para los aislamientos N1 y 97 usando la plataforma FastQC de Illumina (<https://basespace.illumina.com/apps/706706/FastQC?preferredversion>).

4.2.2 Ensamblado y análisis de calidad del ensamblado

Se realizó el ensamblado *de novo* de las lecturas obtenidas a partir de las NGS realizadas sobre los aislamientos N1 y 97 utilizando el *software* SPAdes (versión 3.9.0) disponible en la plataforma *BaseSpace®* de Illumina. Dicho *software* realizó un análisis

de calidad del proceso de ensamblado, donde se informó el N50, el L50, la cantidad de *contigs* obtenidos y el tamaño de estos.

4.2.3 Anotación de genomas

Se realizó la anotación mediante RAST (<https://rast.nmpdr.org/>) de los ensamblados obtenidos para las NGS de los aislamientos N1 y 97, lo que permitió reconocer la presencia de múltiples genes y clasificarlos según sistemas y subsistemas de acuerdo a su posible función. Se focalizó el estudio en las secuencias que contienen a los genes *bla*_{CTX-M} y aquellos asociados a su movilización.

Dentro de la plataforma se encuentra la herramienta *the SEED Viewer* que permitió visualizar los resultados obtenidos, por un lado, los genes agrupados en los sistemas y subsistemas, y por otro, la representación esquemática de cada *contig*, donde fue posible observar la ubicación de cada gen identificado.

4.2.4 Caracterización mediante herramientas bioinformáticas

4.2.4.1 Flujo de análisis bioinformático bacteriano

Se realizó un análisis global de los *contigs* obtenidos para los aislamientos N1 y 97 usando los programas disponibles en diferentes plataformas:

- (1) *BaseSpace*® de Illumina (<https://basespace.illumina.com/>)
- (2) *Pathogenwatch* (<https://pathogen.watch/>)
- (3) *Center for Genomic Epidemiology* (<http://www.genomicepidemiology.org/>)
- (4) *Enterobase* (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>)

Para realizar la tipificación de estos aislamientos se tuvieron en cuenta los resultados arrojados por las diferentes plataformas y se emplearon programas como: MLST (Larsen et al., 2012), *SerotypeFinder* 2.0 (Joensen et al., 2015) para la determinación de serotipo de *E. coli* y *SeqSero* (Zhang et al., 2015) para la determinación de la serovariedad de *Salmonella*. *Bacterial Analysis Pipeline* es capaz de predecir la especie bacteriana según las secuencias ingresadas utilizando un enfoque basado en *Kmer* (Larsen et al., 2014).

Para la detección de elementos genéticos móviles (EGM) o moviloma se utilizaron distintos programas. La búsqueda de plásmidos se hizo mediante la aplicación del software *PlasmidFinder* (Carattoli et al., 2014). La identificación y anotación de secuencias de profagos se realizó mediante *PHASTER* (<https://phaster.ca/>) (Arndt et al., 2016). Los profagos encontrados se categorizaron de acuerdo a un puntaje o *score* en intactos (*score* > 90), cuestionables (90 > *score* > 70) o incompletos (70 > *score*). Se realizó la búsqueda de integrones con *Integrall*

(<http://integrall.bio.ua.pt/>) (Moura et al., 2009), secuencias de inserción y transposones usando *ISfinder* (<https://isfinder.biotoul.fr/>) (Siguier et al., 2006). Para la búsqueda de EGM en general, se utilizó la herramienta MGE - *MobileElementFinder* (Johansson et al., 2021) disponible en el *Center for Genomic Epidemiology*.

La predicción de los posibles determinantes de resistencia a antimicrobianos o resistoma en los genomas secuenciados se realizó con los software *Resfinder* 4.1 (Bortolaia et al., 2020; Camacho et al., 2009; Zankari et al., 2017) y la plataforma CARD (*Comprehensive Antibiotic Resistance Database*, disponible en: <https://card.mcmaster.ca/>) (McArthur et al., 2013). Estas herramientas permiten identificar genes de resistencia a los antimicrobianos mediante un enfoque basado en *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), en el que las secuencias ingresadas se comparan con los genes de la base de datos.

Por último, se realizó un análisis de genes de virulencia para *E. coli* empleando los siguientes programas: *VirulenceFinder* (Joensen et al., 2014), *FimTyper* 1.0 (Roer et al., 2017) y *CHTyper* 1.0 (Roer et al., 2018). Para *Salmonella* se realizó la búsqueda de islas de patogenicidad mediante *SPIFinder* (Roer et al., 2016). Estas herramientas se encuentran disponibles en el *Center for Genomic Epidemiology*.

Mediante la plataforma *EnteroBase* (consultada en octubre de 2021) se determinaron las relaciones genéticas centrales entre los aislamientos de *E. coli* N1 y *S. entérica* serovar Typhimurium 97 y aislamientos diseminados a nivel mundial con un secuenciotipo idéntico, como así también para aislamientos pertenecientes al mismo complejo clonal (CC). Las lecturas correspondientes al aislamiento N1 se depositaron en esta plataforma con el número de acceso: ESC_ZB8992AA_AS, mientras que para el aislamiento 97 se depositaron con el número de acceso: SAL_RC7512AA_AS.

4.2.4.2 Identificación de secuencias plasmídicas y ensamblado combinado de plásmidos

Las secuencias plasmídicas fueron reconocidas mediante los resultados obtenidos del análisis bioinformático bacteriano o por homología de secuencias con plásmidos alojados en base de datos mediante el análisis por BLAST.

La presencia de grupos de incompatibilidad o marcadores de resistencia vinculados frecuentemente a plásmidos permitió asociar la secuencia de cada *contig* a secuencias plasmídicas. En este punto, se dio mayor relevancia a los genes codificantes de β -lactamasas, principalmente *bla*_{CTX-M-2} (para la cepa N1) y *bla*_{CTX-M-14} (para la cepa 97).

Además, cada *contig* fue comparado con las secuencias depositadas en la base de datos del NCBI en busca de plásmidos o secuencias plasmídicas.

Finalmente, una vez reconocidas las secuencias plasmídicas en los diferentes *contigs* se realizó el ensamblado combinado mediante un análisis en BLAST donde se enfrentaron estas secuencias entre ellas de manera tal de poder observar homología en los extremos para poder unir diferentes *contigs* y llegar a conformar la secuencia completa de los plásmidos de interés.

4.2.4.3 Análisis de las secuencias plasmídicas

Las secuencias de los plásmidos ensamblados de forma combinada se analizaron con mayor profundidad, principalmente aquellas portadoras de los genes codificantes de CTX-M-2 (N1) y CTX-M-14 (97). Se realizó la búsqueda de integrones con *Integrall*, secuencias de inserción y transposones usando *ISfinder* (y sistemas de adicción tipo 2 mediante TADB 2.0 (<https://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB2/tools.html>)) (Xie et al., 2018).

Como se dijo anteriormente, para la búsqueda de replicones de plásmidos se utiliza el programa *PlasmidFinder* (Carattoli et al., 2014). Los plásmidos identificados de los grupos *incF*, *IncH1*, *IncH2*, *IncI1*, *IncN* o *IncA/C* (*IncA* e *IncC*) se subtipifican además por el pMLST (Carattoli et al., 2014).

A su vez, se realizó la búsqueda de genes responsables de la transferencia por movilización y conjugación de plásmidos mediante homología de secuencia, usando BLAST. También, se usaron los resultados obtenidos en la anotación del genoma para complementar la información a partir de las diferentes plataformas mencionadas. La visualización de las secuencias anotadas en RAST se realizó usando la plataforma *SEED viewer* (Overbeek et al., 2014).

4.2.4.4 Comparación de plásmidos

Se realizó una búsqueda por homología en la base de datos *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de plásmidos usando las secuencias plasmídicas ensambladas en los análisis previos. Se realizó la comparación entre ellas utilizando el servidor *online* BLAST.

Además, se evaluó la homología entre los plásmidos similares portadores de *bla*_{CTX-M-2} depositados en base de datos públicas, la secuencia obtenida a partir de *S. enterica* serovar *Infantis* aislada entre los años 1996 y 1998 en la ciudad de Santa Fe (Di Conza et al., 2002) y el plásmido caracterizado del aislamiento de *E. coli* N1.

La representación esquemática de los plásmidos se realizó utilizando la plataforma *GenomeVx* (<http://wolfe.ucd.ie/GenomeVx/>) (Conant & Wolfe, 2008). Para realizar visualmente las comparaciones entre los plásmidos caracterizados y los alojados en bases de datos públicas que presentaron homología se utilizó la herramienta *CGview* (<http://cgview.ca/>) (Grant & Stothard, 2008).

RESULTADOS

4.1 *E. coli* N1

4.1.1 Secuenciación y análisis de calidad de lecturas

La secuenciación se realizó utilizando la técnica *MiSeq* de *Paired-end reads* con lecturas de 2 x 75 pb. Los resultados generados fueron almacenados en 8 archivos en formato FASTQ.

El análisis de calidad de las lecturas se llevó a cabo usando FastQC, en el cual se analizaron los archivos FASTQ por separado y el *software* produjo un informe por cada uno.

El tamaño total de los datos producidos en la secuenciación equivale a 721,23 MB con 12.011.894 lecturas (N). Considerando una longitud de lecturas promedio (L) de 75 pb, la cobertura promedio (CP) estimada fue de 170 para un tamaño de genoma estimado para *E. coli* (G) de 5.332.762 pb.

Los resultados obtenidos a partir del análisis realizado con FastQC de las secuencias crudas (8 archivos en formato FASTQ) evaluadas se resumen en la tabla 22 (estadísticas básicas) y el resto de los parámetros de calidad evaluados en la tabla 23.

Tabla 22: Estadísticas básicas obtenidas del análisis de calidad realizado con FastQC de las secuencias crudas generadas en la secuenciación del aislamiento de *E. coli* N1.

Archivos	LRAT12_S36_L001_R1_001.fastq	LRAT12_S36_L001_R2_001.fastq	LRAT12_S36_L002_R1_001.fastq	LRAT12_S36_L002_R2_001.fastq	LRAT12_S36_L003_R1_001.fastq	LRAT12_S36_L003_R2_001.fastq	LRAT12_S36_L004_R1_001.fastq	LRAT12_S36_L004_R2_001.fastq
Estadísticas								
Codificación	Sanger / Illumina 1.9							
Total de secuencias	1.469.124	1.469.124	1.530.339	1.530.339	1.533.470	1.533.470	1.473.014	1.473.014
Rango de longitud de secuencias (pb)	35-75	35-75	35-75	35-75	35-75	35-75	35-75	35-75
% de G+C	49	49	49	49	49	49	49	49

Tabla 23: Parámetros de calidad de secuenciación del aislamiento de *E. coli* N1 obtenidos del análisis realizado con FastQC.

Archivos	LRAT12_S36_L001_R1_001.fastq	LRAT12_S36_L001_R2_001.fastq	LRAT12_S36_L002_R1_001.fastq	LRAT12_S36_L002_R2_001.fastq	LRAT12_S36_L003_R1_001.fastq	LRAT12_S36_L003_R2_001.fastq	LRAT12_S36_L004_R1_001.fastq	LRAT12_S36_L004_R2_001.fastq
Parámetro evaluado								
Calidad base por base								
Puntajes de calidad por secuencia								
Contenido de secuencia por base								
Contenido de CG por secuencia								
Contenido de N por base								
Distribución de la longitud de secuencias								
Secuencias duplicadas								
Secuencias sobrerrepresentadas								
Contenido de Kmer								

Mensaje de aprobación
 Mensaje de error
 Mensaje de advertencia

El mensaje de error producido en el módulo “contenido de secuencia por base” es normal para algunas bibliotecas, ya que suelen heredar un sesgo intrínseco o técnico en el proceso de secuenciación en las posiciones en las que comienzan las lecturas. De acuerdo a este argumento, se consideró que este error no era determinante para reprobare la calidad de las secuencias obtenidas y se continuó con los análisis posteriores.

4.1.2 Ensamblado de lecturas y generación de *contigs*

El ensamblado de las secuencias crudas obtenidas mediante la secuenciación del aislamiento de *E. coli* N1 produjo un total de 432 *contigs* de los cuales 165 mostraron un tamaño mayor a 1000 pb. La suma total de los *contigs* generados tiene un tamaño de 5.332.762 pb y la suma de los *contigs* mayores a 1.000 pb es de 5.245.121 pb. Se obtuvo un N50 de 88.406 pb y un L50 de 19. Además, el programa

no tuvo que acomodar nucleótidos al azar para realizar el ensamblado ya que se obtuvo un “N's per100 kbp” de 0. El porcentaje de G+C determinado fue de 50,52%.

4.1.3 Anotación de genoma completo

La anotación de los 432 *contigs* de *E. coli* N1 generó la identificación de 5278 CDS de los cuales 80% fueron agrupados en 26 sistemas y 608 subsistemas (ver en la sección Anexos tabla 28). Por otro lado, 1311 CDS se caracterizaron como proteínas hipotéticas.

A partir de la información obtenida se focalizó el análisis en los sistemas de “virulencia, enfermedad y defensa” y “fagos, profagos, elementos transponibles y plásmidos”. De esta manera, se localizó el gen *bla*_{CTX-M-2} previamente caracterizado (ver capítulo 2) en el *contig* 7, donde a su vez, se encontró el gen codificante para la enzima integrasa y otros marcadores de resistencia que se describirán posteriormente. El *contig* 7 presentó un tamaño de 156.865 pb. El análisis realizado con RAST se complementó con el análisis bioinformático bacteriano.

El genoma completo de *E. coli* N1 ha sido depositado en *GenBank* bajo el número de acceso JABACN000000000.

4.1.4 Flujo de análisis bioinformático bacteriano

El análisis global aportó información general del aislamiento evaluando el total de los *contigs* obtenidos.

Se determinó la especie confirmando los resultados obtenidos previamente (ver capítulo 1). Se determinaron dos secuenciotipos mediante MLST de acuerdo a las bases de datos *Enterobase* (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) o *Institut Pasteur MLST* (<https://bigsdbs.pasteur.fr/index.html>), de esta manera se obtuvo el ST8125 (Perfil alélico: *adk-10*, *funC-11*, *gyrB-681*, *icd-8*, *mdh-8*, *purA-8* y *recA-2*), el cual pertenece al complejo clonal CC10 de acuerdo a la base de datos *Enterobase* y el ST2 (Perfil alélico: *dinB-8*, *icdA-2*, *pabB-7*, *polB-3*, *putP-7*, *trpA-1*, *trpB-4* y *uidA-2*) para la base de datos *Institut Pasteur MLST*.

Empleando las diferentes herramientas bioinformáticas para la caracterización del resistoma, se encontraron los marcadores de resistencia plasmídicos *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{TEM-1} (resistencia a β-lactámicos), *aac(6')*-*Ib*, *aac(3)-IIa* (resistencia a aminoglucósidos), *sul1* (por duplicado) (resistencia a sulfamidas) y *dfrA8* (resistencia a trimetoprima). No se encontraron mutaciones en las regiones determinantes de resistencia a quinolonas (QRDR) de las topoisomerasas II y IV (GyrA/B o ParC/E). Los marcadores de resistencia detectados se resumen en la tabla 24.

Tabla 24: Marcadores de resistencia identificados *in silico* en el aislamiento *E. coli* N1.

Genes de resistencia	Tamaño del gen (pb)	Contig	Posición del gen en el contig	Fenotipo de resistencia
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	876	7	148790 - 149665	β-lactámicos
<i>bla</i> _{OXA-2}	828	7	143882 - 144709	β-lactámicos
<i>bla</i> _{TEM-1}	861	158	177 - 1037	β-lactámicos
<i>aac</i> (6')-Ib	519	7	143282 - 143800	Aminoglucósidos
<i>aac</i> (3)-IIa	861	80	6403 - 7263	Aminoglucósidos
<i>sul1</i>	927	7	145419 - 146345	Sulfamidas
<i>sul1</i>	927	7	151003 - 151929	Sulfamidas
<i>dfrA8</i>	510	146	682 - 1191	Trimetoprima

La búsqueda de replicones plasmídicos mostró la presencia de los grupos de incompatibilidad IncA/C₂ (IncC) en el *contig* 7 e IncI-1 en el *contig* 61. La tipificación mediante pMLST del plásmido del grupo IncC mostró que pertenece al secuenciotipo ST-3 (Perfil alélico: *A053-1*, *parA-2*, *parB-2* y *repA-2*), mientras que la del grupo IncI-1 fue desconocida o indeterminada (Perfil alélico: *arda-4*, *pill-3*, *repI1-2*, *sogS-3* y *trbA-6*) (*Plasmid* MLST, <https://pubmlst.org/>). Continuando con el análisis del moviloma se encontraron las secuencias de inserción IS609, ISEc18, IS5, ISEc31, IS421 e IS26 asociadas a ADN cromosómico y las ISKpn11, ISKpn12 y ISKpn13 y el transposón Tn6196 vinculadas a ADN plasmídico. Por otro lado, el uso de la plataforma PHASTER permitió reconocer 9 regiones de profagos, de las cuales 1 se encontró intacta, 1 cuestionable y 7 estaban incompletas. El profago completo corresponde a 4LV2017 de *Klebsiella* (Figura 42). Ninguna de las regiones de profagos se encontró vinculada al resistoma o a factores de virulencia (viruloma).

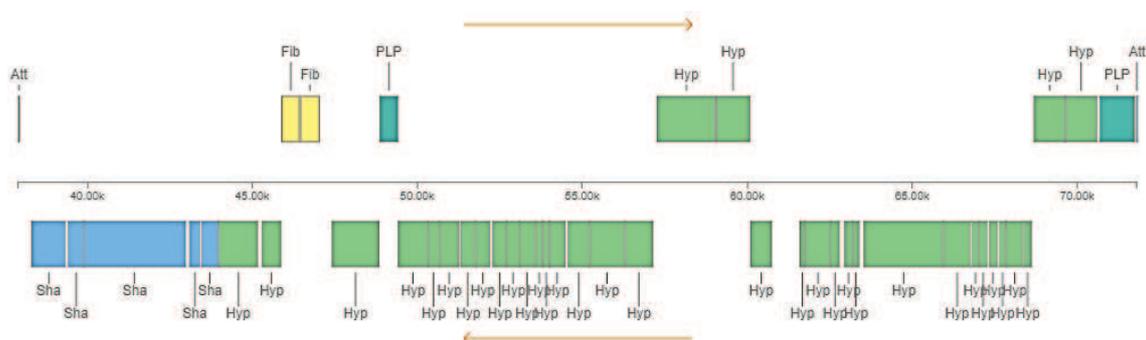


Figura 42: Representación esquemática del fago 4LV2017 (de 33,8 Kb) integrado al *contig* 11 correspondiente al ADN cromosómico del aislamiento de *E. coli* N1. Att: Sitio de fijación; Sha: Proteínas de cola; Fib: Proteína de fibra; PLP: Proteína fágica; Hyp: Proteína hipotética.

Posteriormente, se determinó el serotipo O48:H32 y la plataforma *EnteroBase* clasifica a este aislamiento como perteneciente al grupo filogenético A correspondiente al esquema de Clermont (Clermont et al., 2013). Con la utilización de la plataforma *VirulenceFinder* se detectaron los factores de virulencia *afaD* (adhesión celular), *capU* (hexosiltransferasa), *iha* (proteína de adherencia), *iss* (incremento de la supervivencia en suero), *iucC* (sintetasa de aerobactina), *iutA* (receptor férrico), *mchC* (proteína MchC), *mchF* (transportador proteico MchF), *ompT* (proteasa), *sigA* (proteasa), *terC* (proteína de resistencia al ión telurio), *traT* (complemento de resistencia) y *sitA* (proteína transportadora de hierro), todos vinculados a ADN cromosómico. Mediante *FimTyper* y *CHTyper* se encontró el alelo *fimH-54* (adhesión) y *funC-11* (vía metabólica). No se detectó ningún factor de virulencia en secuencias plasmídicas.

4.1.5 Reconocimiento de plásmidos y secuencias plasmídicas

Se analizó la asociación de *bla*_{CTX-M-2} con plásmidos o secuencias plasmídicas. De esta manera, el *contig* portador del gen *bla*_{CTX-M-2} (*contig 7*) se alineó usando BLAST con secuencias plasmídicas alojadas en la base de datos *GenBank*.

El *contig 7* presentó varios genes y componentes que lo hicieron sospechoso de ser un plásmido conjugativo o en todo caso una secuencia plasmídica parcial. Por un lado, el replicón plasmídico Inc A/C₂ y por el otro lado, la presencia del gen codificante de CTX-M-2 ampliamente asociadas a plásmidos.

Tomando como secuencia base al *contig 7* se continuó con el ensamblado manual del plásmido portador del gen *bla*_{CTX-M-2}, de esta manera se determinó que este está compuesto por los *contigs* 156 (secuencia reversa complementaria), 7, 158 y 80 (secuencia reversa complementaria), aunque cabe destacar que el plásmido obtenido no pudo circularizarse, no encontrándose homología en sus extremos.

La secuencia plasmídica parcial obtenida presentó un tamaño de 166.347 pb, valor muy cercano a 160 Kb determinado previamente mediante PFGE (ver capítulo 2). De acuerdo a estos resultados se nombró a esta secuencia como pN1 y se la utilizó para los posteriores análisis bioinformáticos.

4.1.6 Análisis del plásmido de interés (pN1)

La secuencia pN1 se analizó en RAST donde se observó que la misma presentó un porcentaje de G+C del 52,1% y 211 CDS, de los cuales 40 pudieron ser agrupados en sistemas, 46 presentaron alguna función específica y 125 se definieron como codificantes de proteínas hipotéticas. El análisis posterior se focalizó en los genes ubicados dentro de los sistemas (y subsistemas) “virulencia, enfermedad y

defensa" (resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos), "fagos, profagos, elementos transponibles y plásmidos" y "transporte de membrana" (proteínas y nucleoproteínas del sistema de secreción tipo IV).

Usando la plataforma *ResFinder* y como se mencionó anteriormente, se encontraron los genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{OXA-2}, *aac*(6')-Ib, *sul1* (dos copias) y *qacEΔ1* (dos copias). Mediante *Integrall* y el análisis en RAST se identificó la secuencia codificante de la enzima integrasa de tipo I poniendo de manifiesto la presencia del integrón de clase 1 en este plásmido. Se observó que todos estos elementos se organizan en un integrón inusual o complejo de clase 1 (Figura 43), donde los genes *bla*_{OXA-2}, *aac*(6')-Ib se encontraron como casetes de resistencia que formando parte de la clásica región variable (se integra en la secuencia *attI*) y el gen *bla*_{CTX-M-2} se ubicó en la región inusual de la secuencia, antes de la segunda región conservada 3'. En ambas regiones conservadas 3' se encontraron los genes *qacEΔ1* y *sul1*.

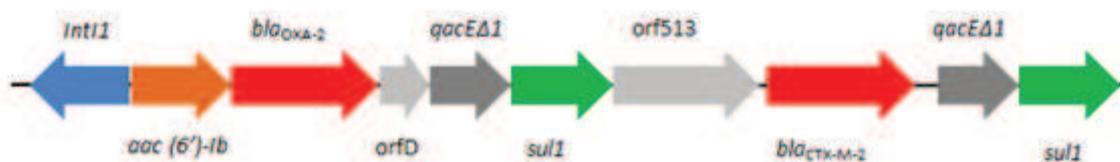


Figura 43: Estructura del integrón complejo de clase 1 encontrado en la secuencia plasmídica pN1.

Flanqueando al integrón complejo se encontraron secuencias incompletas correspondientes a transposones de la familia Tn3 (*TnAs3* e *ISEc63*), la secuencia completa de transposón *Tn6196* y las secuencias de inserción *IS4321R* completa (familia *IS110*) y un fragmento de la *IS1326* (familia *IS21*).

Por fuera del integrón se localizaron los genes *aac*(3)-IIa y *bla*_{TEM-1} flanqueados por la *ISEc63* incompleta perteneciente a la familia del Tn3 y las secuencias completas de las *ISKpn11* y *ISKpn12* pertenecientes a las familias de las IS3 e IS5 respectivamente.

A su vez, el plásmido pN1 presenta las herramientas necesarias para llevar a cabo su conjugación, codificando proteínas T4CP (*TraD*, *TraN* y *TraG*) y tipo *Tra* (*TraA*, *TraE*, *TraK*, *TraB*, *TraV*, *TraC*, *TraW*, *TraF*, *TraH*, *TraL* y *TraU*) que conforman el T4SS responsable de la movilización y secreción de plásmidos y la proteína *TraI*, componente del relaxoma, perteneciente al sistema de movilidad H (*MOB*_{H121}).

Este plásmido, también presenta una región de genes conocida como operón *mer*, la cual expresa proteínas que confieren resistencia a compuestos de mercurio (II)

MN065773.1 respectivamente), incluyen casi la totalidad de la secuencia del plásmido pN1, mostrando en ambos casos una cobertura del 98% y una identidad del 99%.

Por otro lado, se observó que pN1 comparte un 99% de identidad con una cobertura del 92% con el plásmido pS21 (154.342 pb) el cual fue previamente caracterizado por nuestro grupo de trabajo (número de acceso: MT316184.1), y que fue obtenido de un aislamiento de *S. enterica* aislado entre los años 1997 y 1998 en la ciudad de Santa Fe, Argentina (Di Conza et al., 2002). La diferencia entre ambos plásmidos se encuentra en una región de aproximadamente 10 Kpb donde se localiza el operón *mer* (Figura 44). El operón *mer* también está presente en los plásmidos pUR-KP0923 y pUR-KP1025 antes mencionados.

Otro plásmido que presentó homología (92% de cobertura con 99% de identidad) con el pN1 fue pCR14_2 (154.343 pb) caracterizado en *K. pneumoniae* y aislado en Estados Unidos (Número de acceso: CP015394.1). El mismo, contiene al integrón complejo encontrado en pN1 y pS21.

La comparación esquemática de estos plásmidos con respecto a pN1 se muestra en la figura 45.

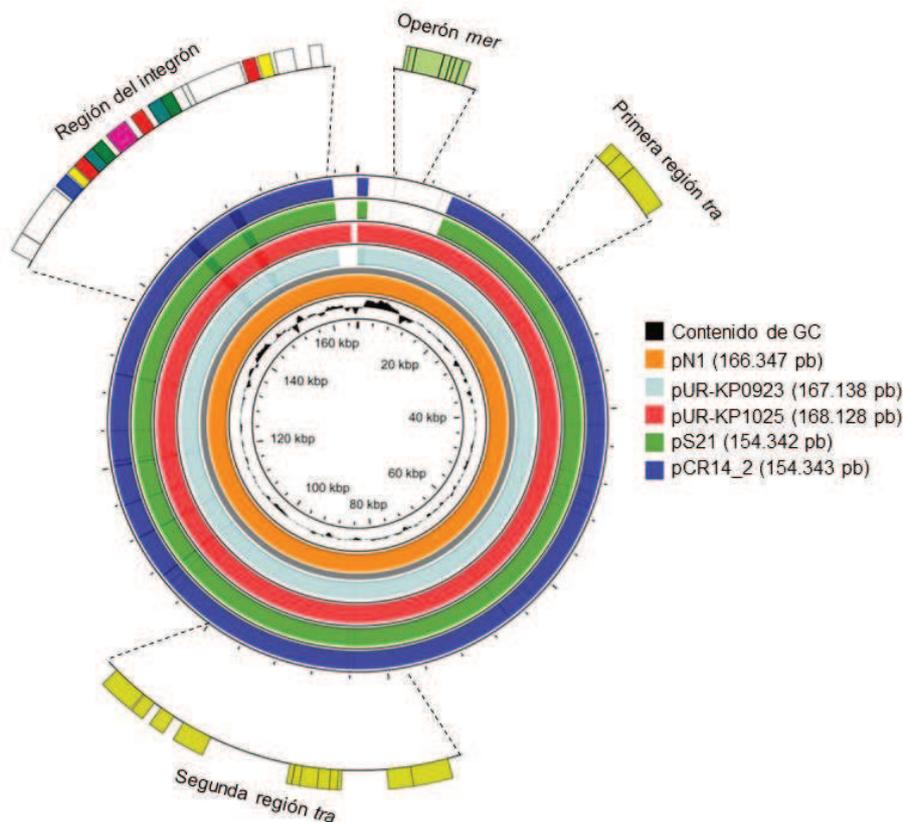


Figura 45: Esquema comparativo de similitud entre el plásmido pN1 y los plásmidos pUR-KP0923, pUR-KP1025, pS21 y pCR14_2. Las zonas que aparecen de color blanco representan las regiones ausentes en los plásmidos comparados. En forma aumentada se muestran las regiones más representativas del plásmido pN1 (región del integrón, operón *mer* y regiones *tra*). En el centro del esquema se representa (en color negro) el contenido de GC para el plásmido pN1.

4.2 *S. entérica* serovar Typhimurium 97

4.2.1 Secuenciación y análisis de calidad de lecturas

La secuenciación también se realizó utilizando la técnica *MiSeq* de *Paired-end reads* con lecturas de 2 x 75 pb y al igual que en el caso anterior, los resultados generados fueron almacenados en 8 archivos en formato FASTQ.

El análisis de calidad de las lecturas realizado mediante FastQC produjo un informe por cada uno los archivos FASTQ evaluado. El tamaño total de los datos producidos en la secuenciación equivale a 1,32 GB con 22.754.632 lecturas. La cobertura promedio obtenida fue de 334 usando un tamaño estimado de genoma para *S. entérica* serovar Typhimurium de 5.121.450 pb.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de las secuencias crudas realizado con FastQC se resumen en la tabla 25 (estadísticas básicas) y el resto de los parámetros de calidad evaluados en la tabla 26.

Tabla 25: Estadísticas básicas obtenidas del análisis de calidad realizado con FastQC de las secuencias crudas generadas en la secuenciación del aislamiento de *S. entérica* serovar Typhimurium 97.

Archivos	LRAT13_S37_L001_R1_001.fastq	LRAT13_S37_L001_R2_001.fastq	LRAT13_S37_L002_R1_001.fastq	LRAT13_S37_L002_R2_001.fastq	LRAT13_S37_L003_R1_001.fastq	LRAT13_S37_L003_R2_001.fastq	LRAT13_S37_L004_R1_001.fastq	LRAT13_S37_L004_R2_001.fastq
Estadísticas								
Codificación	Sanger / Illumina 1.9							
Total de secuencias	2.788.355	2.788.355	2.899.268	2.899.268	2.910.742	2.910.742	2.778.951	2.778.951
Rango de longitud de secuencias (pb)	35-75	35-75	35-75	35-75	35-75	35-75	35-75	35-75
% de G+C	50	50	50	50	50	50	50	50

Tabla 26: Parámetros de calidad de secuenciación del aislamiento de *S. entérica* serovar Typhimurium 97 obtenidos del análisis realizado con FastQC.

Archivos	LRAT13_S37_L001_R1_001.fastq	LRAT13_S37_L001_R2_001.fastq	LRAT13_S37_L002_R1_001.fastq	LRAT13_S37_L002_R2_001.fastq	LRAT13_S37_L003_R1_001.fastq	LRAT13_S37_L003_R2_001.fastq	LRAT13_S37_L004_R1_001.fastq	LRAT13_S37_L004_R2_001.fastq
Calidad base por base								
Puntajes de calidad por secuencia								
Contenido de secuencia por base								
Contenido de CG por secuencia								
Contenido de N por base								
Distribución de la longitud de secuencias								
Secuencias duplicadas								
Secuencias sobrerrepresentadas								
Contenido de Kmer								

- Mensaje de aprobación
- Mensaje de error
- Mensaje de advertencia

De igual manera a lo sucedido para el aislamiento N1, se desestimó el mensaje de error producido en el módulo “contenido de secuencia por base” y se continuó con los análisis posteriores.

4.2.2 Ensamblado de lecturas y generación de *contigs*

El análisis de calidad del proceso de ensamblado de las secuencias crudas informó el N50, L50, la cantidad de *contigs* obtenidos y el tamaño de los mismos. El ensamblado de las lecturas produjo un total de 140 *contigs* de los cuales 77 presentaron un tamaño mayor a 1000 pb. La suma total de los *contigs* generados tiene un tamaño de 5.121.450 pb y la suma de los *contigs* mayores a 1000 pb es de 5.102.632 pb. Se obtuvo un N50 de 200.971 pb y un L50 de 9. Además, el programa no tuvo que acomodar nucleótidos al azar para realizar el ensamblado ya que se obtuvo un “N's per100 kbp” de 0. El porcentaje de G+C determinado fue de 52,07%.

4.2.3 Anotación de genoma completo

Al igual que en el aislamiento anterior, los genes identificados se agruparon en sistemas y subsistemas según su función, de esta manera se focalizó el estudio de las secuencias que contienen los genes de resistencia a CTG y aquellos asociados a su movilización.

La anotación de los 140 *contigs* de *S. entérica* serovar Typhimurium 97 generó la identificación de 5193 CDS de los cuales 81% fueron agrupados en 26 sistemas y 583 subsistemas (ver en la sección Anexos tabla 29). Por otro lado, 1098 CDS se caracterizaron como proteínas hipotéticas.

A partir de la información obtenida se focalizó el análisis en los sistemas de “virulencia, enfermedad y defensa” y “fagos, profagos, elementos transponibles y plásmidos”. De esta manera, se localizó el gen *bla*_{CTX-M-14} previamente caracterizado (ver capítulo 2) en el *contig* 63. Este *contig* presentó un tamaño de 2.263 pb. El análisis realizado con RAST se complementó con el análisis bioinformático bacteriano.

El genoma completo de *S. Typhimurium* 97 ha sido depositado en *GenBank* bajo el número de acceso JAJGZE000000000.

4.2.4 Flujo de análisis bioinformático bacteriano

El análisis confirmó los resultados obtenidos previamente (ver capítulo 1) en cuanto a especie y serovariedad. Se determinó el secuenciotipo ST19 (Perfil alélico: *aroC-10*, *dnaN-7*, *hemD-12*, *hisD-9*, *purE-5*, *sucA-9* y *thrA-2*) de acuerdo al MLST realizado en las plataformas *EnteroBase* y *Pathogenwatch*.

Se encontraron los marcadores de resistencia plasmídicos *bla*_{CTX-M-14} (resistencia a β -lactámicos) en el *contig* 63 (2.243 pb) y *qnrB19* (resistencia a quinolonas) en el *contig* 57 (2.754 pb). Por otro lado, se encontró el marcador de resistencia *aac(6')-Iaa* (resistencia a aminoglucósidos) en el *contig* 3 (340.753 pb) el cual está presente en el cromosoma. No se encontraron mutaciones en las regiones QRDR de las topoisomerasas II y IV (*GyrA/B* o *ParC/E*) asociadas a resistencia a quinolonas.

Los marcadores de resistencia encontrados se resumen en la tabla 27.

La búsqueda de replicones plasmídicos mostró la presencia del grupo de incompatibilidad IncI1 en el *contig* 16 (100.331 pb), los grupos IncFIB(S)/IncFII(S) en el *contig* 17 (95.822 pb) y el grupo Col(pHAD28) en el *contig* 57 (2.754 pb). La tipificación de los grupos IncI1 e IncF mostraron los secuenciotipos plasmídico ST-80 (perfil alélico: *ardA-4*, *pill-2*, *repl1-1*, *sogS-4* y *trbA-5*), perteneciente al complejo clonal CC-31, para IncI1 y S1:A:B17 (Perfil alélico: *FIB-17* y *FII-1*) para IncF, de acuerdo a

Plasmid MLST. Hasta la actualidad no hay esquema disponible para plásmidos tipo Col.

Tabla 27: Marcadores de resistencia identificados *in silico* en el aislamiento *S. entérica* serovar Typhimurium 97.

Genes de resistencia	Tamaño del gen (pb)	Contig	Posición del gen en el contig	Fenotipo de resistencia
<i>bla</i> _{CTX-M-14}	876	63	1114 - 1989	β-lactámicos
<i>qnrB19</i>	645	57	921 - 1565	quinolonas
<i>aac(6')-Iaa</i>	438	3	133230 - 133667	aminoglucósidos

Continuando con el análisis del moviloma, se encontraron las secuencias de inserción *ISEcl10*, *ISSen1* e *ISVsa5* asociadas a ADN cromosómico e *IS903B*, *IS682*, *ISSbo1*, *IS100* e *ISSen7* completas y fragmentos de *ISEcp1* e *IS15DI* vinculadas a ADN plasmídico. Por otro lado, el uso de la plataforma *PHASTER* permitió reconocer 15 regiones de profagos, de las cuales 6 se encontraron intactas, 1 cuestionable y 8 estaban incompletas. Todas estas regiones de profagos estaban ubicadas en regiones cromosómicas del genoma de *S. Typhimurium* 97 y no se encontraron vinculadas al resistoma bacteriano ni a islas de patogenicidad. Las regiones intactas encontradas corresponden a los profagos SPN1S, ST64T, Fels-2, 118970-sal3, Gifsy-1 y Gifsy-2 relacionadas a *Salmonella* y otros *Enterobacterales*. En la figura 46 se muestra a modo de ejemplo la representación esquemática de fago Gifsy-2.

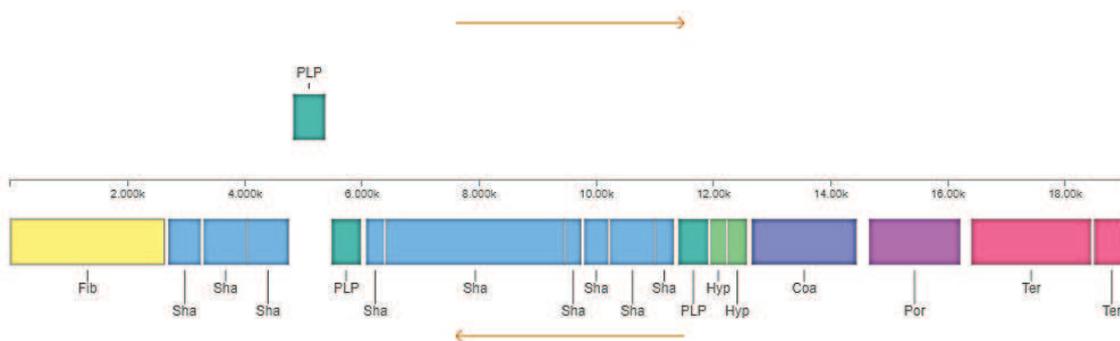


Figura 46: Representación esquemática del fago Gifsy-2 (de 19 Kb) integrado al contig 43 correspondiente a ADN cromosómico del aislamiento de *S. Typhimurium* 97. Sha: Proteínas de cola; Fib: Proteína de fibra; PLP: Proteína fágica; Hyp: Proteína hipotética; Coa: Proteína de la cápside; Por: Proteasa; Ter: Terminasa.

Por otro lado, los genes de virulencia de *Salmonella* suelen estar localizados en islas de patogenicidad (SPI) en el cromosoma que se adquirieron por transferencia horizontal; un subconjunto de SPI es genéticamente inestable y, en estos casos, las

secuencias asociadas con la movilidad del ADN (integrasas, transposasas, repeticiones directas, genes de bacteriófagos) pueden detectarse dentro de la SPI. Se encontraron las islas de patogenicidad C63PI, SPI-1 y SPI-13 en el *contig* 1 (473.521 pb), SPI-3 en el *contig* 2 (376.462 pb), SPI-2 en el *contig* 5 (258.711 pb), la isla CS54 en el *contig* 10 (179.808 pb), SPI-14 en el *contig* 13 (149.348 pb), SPI-5 en el *contig* 18 (92.763 pb) y SPI-9 en el *contig* 28 (52.424 pb). Todas las islas de patogenicidad se detectaron en *contigs* que correspondientes a secuencias cromosómicas.

4.2.5 Reconocimiento de plásmidos y secuencias plasmídicas

Se analizó la asociación de *bla*_{CTX-M-14} con plásmidos o secuencias plasmídicas. De esta manera, el *contig* portador del gen *bla*_{CTX-M-14} se alineó usando BLAST con secuencias plasmídicas alojadas en la base de datos *GenBank*. A su vez, se evaluaron otros *contigs* sospechados de contener secuencias plasmídicas.

El *contig* 63 mostró similitud con porciones de numerosos plásmidos caracterizados en diferentes enterobacterias. Dichos plásmidos mostraron tamaños entre 46 Kpb a 300 Kpb aproximadamente.

Por su parte, el *contig* 57 (portador de *qnrB19*) mostró similitud con plásmidos de tamaños pequeños (2500 pb a 4500 pb) también caracterizados en diferentes aislamientos de enterobacterias. Posteriormente, se analizaron los extremos de este *contig* observándose que existía repetición de secuencia en ambas regiones terminales, de esta manera pudo ser obtenida la secuencia cerrada y completa del plásmido portador de *qnrB19*. Este plásmido se nombró como pQNR97 y presentó un tamaño de 2.699 pb.

Con el objetivo de obtener una secuencia plasmídica completa que contenga al gen codificante de CTX-M-14 se realizó el ensamblado manual de los *contigs* obtenidos. De esta manera se obtuvo una secuencia que combina a los *contigs* 16 y 63 la cual se denominó pSeT97. La búsqueda de homología usando BLAST mostró que el *contig* 16 presenta alta homología (mayor al 98% de identidad) y coberturas mayores al 70% con numerosas secuencias plasmídicas de *Salmonella* (más de 100) alojadas en la base de datos *GenBank* (consultado en octubre 2021). Se determinó que pSeT97 es el plásmido portador de *bla*_{CTX-M-14} en el aislamiento *S. entérica* serovar Typhimurium 97. Sin embargo, esta secuencia no pudo circularizarse.

Finalmente, se observó que el *contig* 17, muestra similitud con numerosas secuencias plasmídicas de *Salmonella* (el programa selecciona 100 secuencias) con cobertura del 97 % y con 99% de identidad, donde casi su totalidad corresponden a plásmidos obtenidos de aislamientos de *S. entérica* serovar Typhimurium. Este *contig*,

que presenta el grupo de incompatibilidad IncFIB(S)/IncFII(S) no presenta genes de resistencia asociados y dentro de elementos movilizables muestra las secuencias de inserción IS100 e ISSen7.

4.2.6 Análisis de los plásmidos pSeT97 y pQNR97

El plásmido pSeT97 portador de *bla*_{CTX-M-14} se analizó en RAST. Se observó que este presentó un tamaño de 102.541 pb, un porcentaje de G+C del 49,7% y 138 CDS, de los cuales 44 pudieron ser agrupados en sistemas y 94 se definieron como codificantes de proteínas hipotéticas. El análisis posterior se focalizó en los genes ubicados dentro de los mismos sistemas (y subsistemas) usados en el aislamiento anterior.

Usando la plataforma *ResFinder* se confirmó la presencia del gen *bla*_{CTX-M-14} como único marcador de resistencia. El *software Integrall* no detectó la presencia de integrones. Mediante *PlasmidFinder* se identificó en grupo de incompatibilidad IncI1 y no se encontraron sistemas toxina-antitoxina en esta secuencia.

A través de la plataforma *ISFinder* y RAST se identificaron y ubicaron la secuencia de inserción IS903B completa (familia de IS5) y porciones de las secuencias de inserción *ISEcp1* (familia de IS1380) e IS15DI (familia de IS6). Estos elementos génicos se encuentran flanqueando al gen codificante de la enzima CTX-M-14.

A su vez, el plásmido pSeT97 presenta las herramientas necesarias para llevar a cabo la conjugación bacteriana, codificando proteínas T4CP (TraG, TraN) y otras proteínas Tra (TraJ, TraP, TraS, TraA, TraE, TraK, TraB, TraV, TraC, TraW, TraF, TraH, TraL, TraO, TraR, TraT, TraU, TraQ y TraX) que conforman el T4SS responsable de la movilización y secreción de plásmidos y las proteínas TraM, TraY y TraI, componentes del relaxoma. Se determinó el sistema de movilidad MOB_{P12}.

Todos los elementos mencionados previamente se observan representados esquemáticamente en la figura 47.

Por otro lado, el plásmido pQNR97 mostró la presencia de los genes *qnrB19*, *pspF* (activador transcripcional del operon Psp), *repA* (codificante de la proteína iniciador de la replicación) y la región codificante para una proteína hipotética. En la figura 48 se muestra el esquema correspondiente al plásmido pQNR97 donde se detalla la ubicación de estos genes.

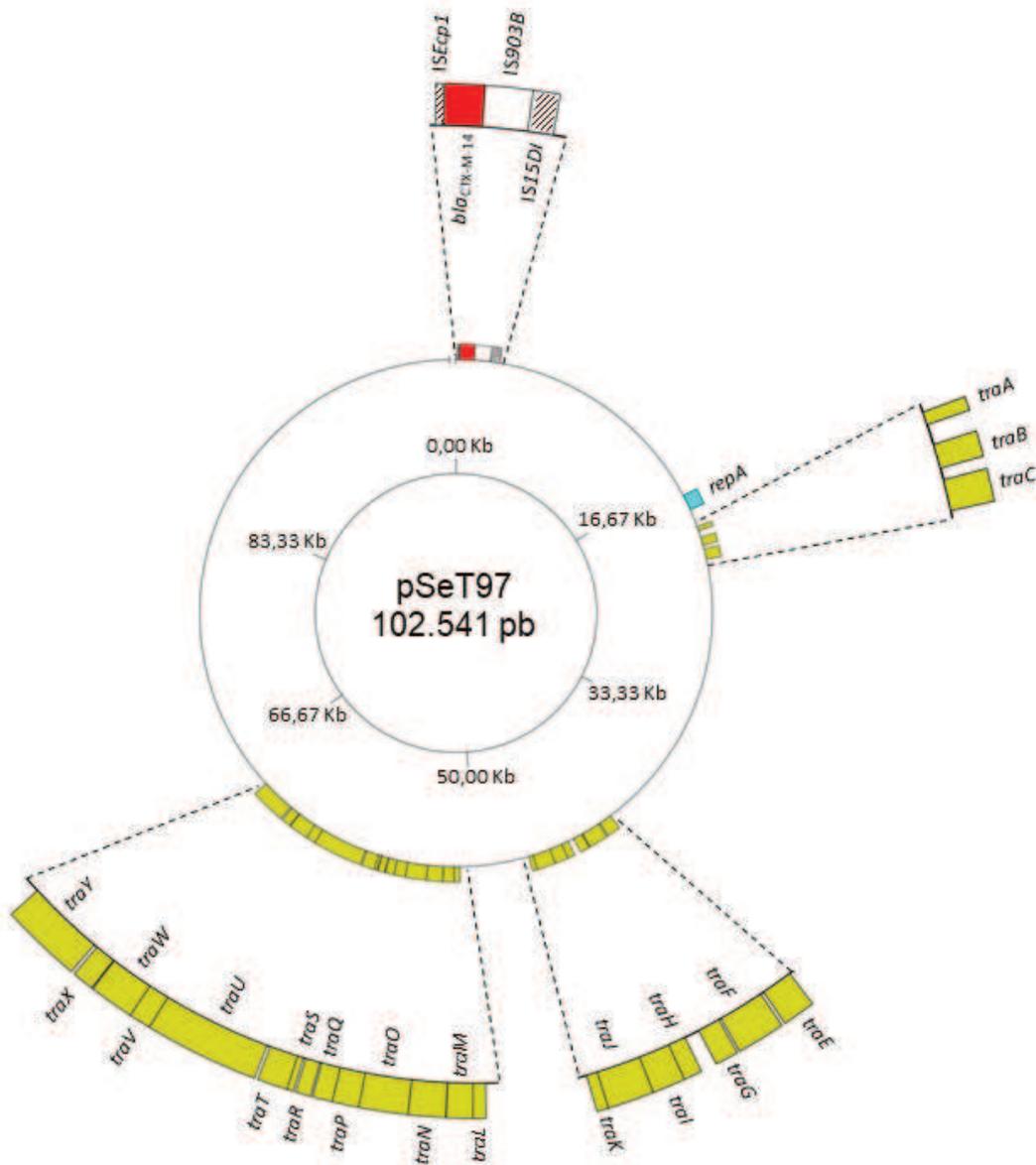


Figura 47: Representación esquemática del plásmido pSeT97. Se observan diferentes regiones relevantes del mismo, por un lado, la región donde se encuentra el gen *bla_{CTX-M-14}* (flanqueada por elementos móviles) y tres regiones ricas en genes codificantes de proteínas Tra, responsables de la conjugación bacteriana. Las IS incompletas se representan con bloques en color blanco con líneas negras paralelas en su interior (rayado) mientras que la IS completa se muestra con bloque de color blanco.

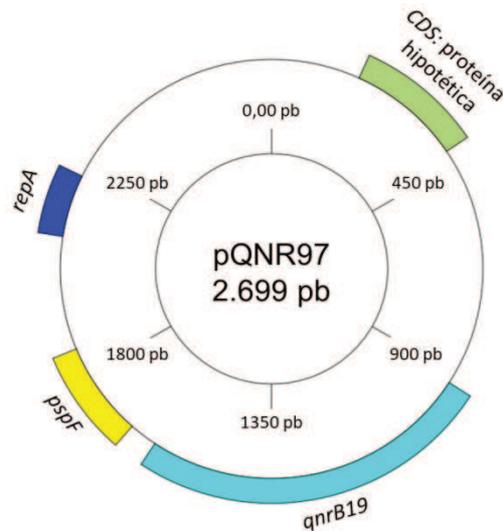


Figura 48: Representación esquemática del plásmido pQNR97. Se muestra la ubicación de los genes *qnrB19*, *pspF*, *repA* y un CDS que codifica para una proteína hipotética.

4.2.7 Comparación de plásmidos con pSeT97 y pQNR97

El plásmido pSeT97 se comparó con plásmidos depositados en base de datos públicas. El plásmido pUR-EC07 (Número de acceso: MH674341.1), obtenido a partir de un aislamiento de *E. coli* de Uruguay, fue el que mostró mayor homología con el plásmido en estudio, mostrando una cobertura del 91% con una identidad del 99%.

Dentro de las regiones ausentes en el plásmido pSeT97 (al compararlo con pUR-EC07) están los genes asociados a la movilidad de elementos génicos (enzima resolvasa Tn2 y transposasa asociada a ISEcp1) y genes de *bla*_{TEM-1} y *ermB* (resistencia a macrólidos).

Otros plásmidos que mostraron homología, aunque con menores porcentajes de cobertura fueron pV404 (89%) (Número de acceso: LM651376.1) el cual fue obtenido de un aislamiento de *E. coli* recuperado en Bolivia, pRHB20-C04_2 (80%) (Número de acceso: CP057639.1) obtenido de un aislamiento de *E. coli* recuperado en el Reino Unido y pECM13 (75%) (Número de acceso: KY865323.1) caracterizado en aislamiento de *E. coli* aislado en China.

Estos resultados se esquematizan en la figura 49.

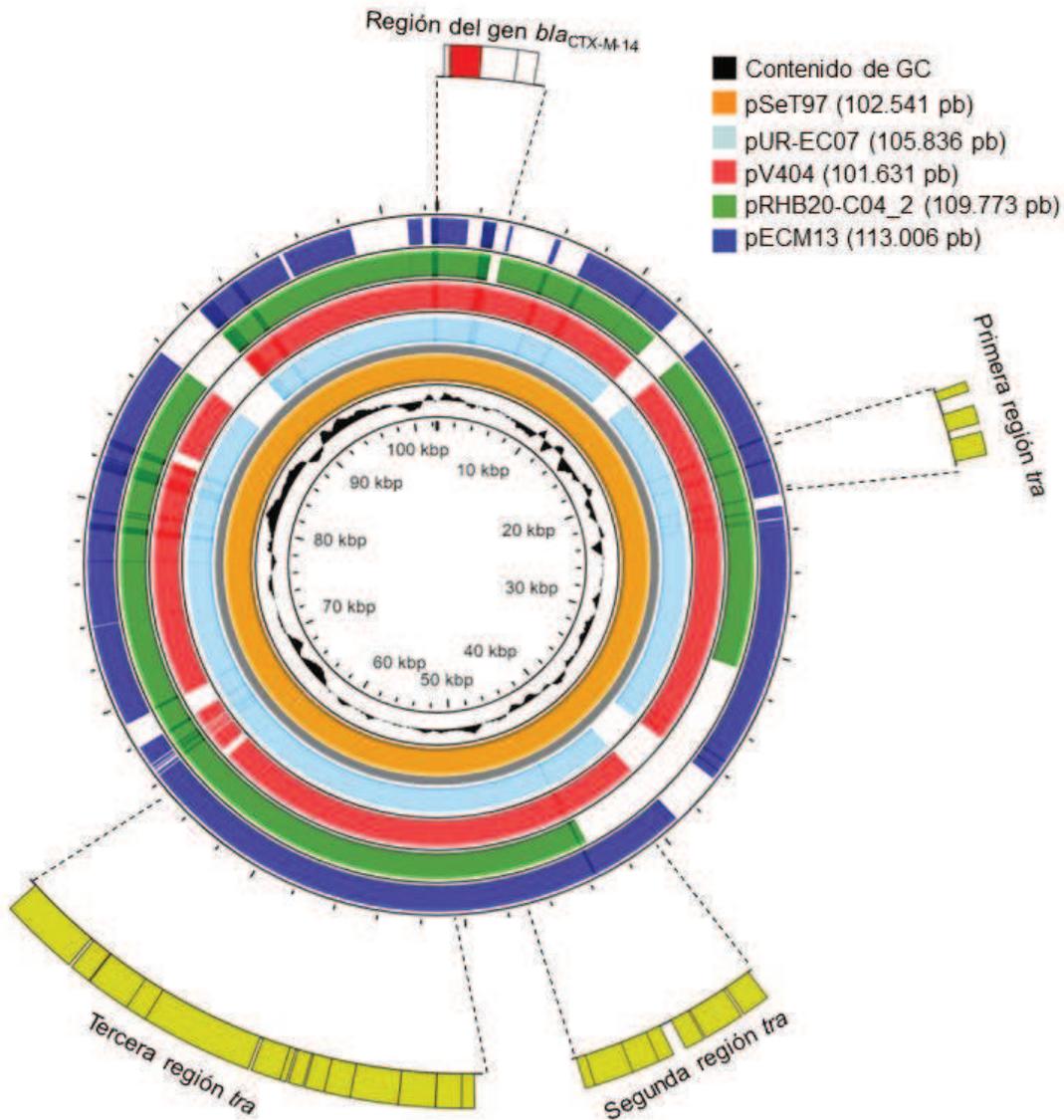


Figura 49: Esquema comparativo entre el plásmido pSeT97 y los plásmidos pUR-EC07, pV404, pRHB20-C04_2 y pECM13. Las zonas que aparecen de color blanco representan las regiones ausentes en los plásmidos comparados con la secuencia del plásmido pSeT97. En forma aumentada se muestran las regiones más representativas del plásmido pSeT97 (región del gen codificante para CTX-M-14 y regiones *tra*). En el centro del esquema (en color negro) se representa el contenido de GC para el plásmido pSeT97.

Al comparar al plásmido pQNR97 con las secuencias depositadas en base de datos se observó que este presentó 100% de identidad y cobertura con varios plásmidos del mismo tamaño (2.699 pb o con muy pocos nucleótidos de diferencia). Estos plásmidos fueron identificados principalmente en aislamientos de *Salmonella*. En Argentina, se caracterizaron los plásmidos pPAB19-1 (Número de acceso: GQ412195) obtenido en *S. Infantis* con un tamaño de 2.699 pb y pPAB19-4 (Número de acceso: JN995611) en *Salmonella* sp. con un tamaño de 2.702 pb. También en América del Sur, se caracterizó el plásmido pMK100 (Número de acceso: HM070379.1) en *S. Infantis* y el plásmido pECY6-7 (Número de acceso: GQ374156.1) en *E. coli*, los

cuales presentaron un tamaño de 2.699 pb y fueron obtenidos en Colombia y Perú, respectivamente. Por último, se observaron plásmidos idénticos, también de 2.699 pb de tamaño, en aislamientos de *S. entérica* recuperados en Canadá (Número de acceso: CP039609.1) y Países Bajos (Número de acceso: FN428572.1).

DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de calidad de secuencias crudas obtenidas por NGS

La cantidad de datos producidos en el proceso de secuenciación está en relación directa al número de ciclos utilizados en el proceso, lo que conlleva a un mayor número de lecturas (mayor cantidad de datos medidos en MB) (Illumina: Read length recommendations, s.f.). La cantidad de ciclos usados a su vez incrementa la cobertura promedio que es uno de los indicadores más confiables para estimar la calidad de un proceso de secuenciación y nos indica la fiabilidad del nucleótido asignado a cada posición del genoma (Rodríguez-Santiago & Armengol, 2012).

Los valores de cobertura promedio obtenidos para ambos aislamientos 170 (cepa N1) y 334 (cepa 97) están por encima del valor mínimo recomendado de 50 para la secuenciación de genomas completos (Desai et al., 2013).

El análisis de calidad realizado con FastQC mostró resultados homogéneos para ambos aislamientos y todos los archivos FASTQ, donde solamente el parámetro “contenido de secuencia por base” es rechazado por la plataforma. La posible explicación radica en que algunas bibliotecas heredan un sesgo intrínseco en el proceso de secuenciación en las posiciones en las que comienzan las lecturas. Este sesgo no se refiere a una secuencia absoluta, sino que se produce por un enriquecimiento de varios *Kmer* diferentes en el extremo 5' de las lecturas. Si bien este es un verdadero sesgo técnico, no es algo que pueda corregirse recortando y, por lo general, no suele afectar negativamente al análisis posterior. Sin embargo, la plataforma de control producirá una advertencia o error en este módulo (Babraham Bioinformatics, s.f.), lo que ocurrió en nuestro análisis.

A su vez, otros tres módulos de análisis arrojaron mensajes de advertencia: “contenido de CG por secuencia”, “distribución de la longitud de secuencias” y “contenido de *Kmer*”. Una advertencia en el módulo “contenido de CG por secuencia” podría indicar un problema con la biblioteca. Este mensaje suele aparecer normalmente como resultado de la presencia de algún contaminante específico (como por ejemplo la presencia de adaptadores), sin embargo, la presencia de secuencias contaminantes también es analizada con mayor detalle en el módulo que evalúa “Secuencias sobrerrepresentadas” (Babraham Bioinformatics, s.f.), el cual no mostró advertencias ni fallas para el total de las secuencias evaluadas, por lo que se descarta la presencia de contaminantes externos. La advertencia generada por el módulo “distribución de la longitud de secuencias” es debida a que todas las secuencias no tienen la misma longitud, sin embargo esta advertencia es completamente normal, ya

que para algunas plataformas de secuenciación es común presentar diferentes longitudes de lectura, por lo que las advertencias aquí pueden ignorarse y continuar con los siguientes pasos del análisis (Babraham Bioinformatics, s.f.). El módulo de control “contenido de *Kmer*” muestra mensajes de advertencia cuando se encuentran secuencias sobrerrepresentadas, incluso si estas aparecen en un umbral inferior al que pueden ser detectadas por el módulo “secuencias sobrerrepresentadas”. Para algunas bibliotecas casi siempre se encontrará un sesgo de *Kmer* al comienzo de las lecturas, generalmente ocasionado por el uso de cebadores aleatorios (Babraham Bioinformatics, s.f.).

En resumen, se consideró que el análisis realizado con FastQC sobre las secuencias crudas obtenidas mediante NGS para los 2 aislamientos estudiados mostró una calidad en las lecturas suficiente o aceptable, de esta manera se continuó con el proceso de ensamblado.

4.2 Ensamblado y anotación de secuencias

Para analizar la calidad relativa de un ensamblado se deben utilizar algunas métricas de calidad. La calidad puede evaluarse con dos características: contigüidad o continuidad y precisión (Paszkiwicz & Studholme, 2010).

La contigüidad se relaciona con la longitud de los *contigs* obtenidos, sin embargo un conjunto de *contigs* no será de una longitud uniforme, por lo que la medida de contigüidad es esencialmente una descripción de una distribución de longitudes (Paszkiwicz & Studholme, 2010). Generalmente este parámetro incluye estadísticas tales como la longitud máxima, la longitud promedio, la longitud total combinada, sin embargo, las más representativas son el N50 y el L50 (Miller et al., 2010). Los ensamblados realizados en este trabajo mostraron diferentes resultados en cuanto al número de *contigs* obtenidos en cada caso y los valores de N50 y L50.

Con los valores alcanzado, donde el N50 obtenido para el aislamiento de *S. enterica* serovar Typhimurium 97 (200.971 pb) es superior al de *E. coli* N1 (88.406 pb) se podría sospechar que el genoma de *S. enterica* presenta un mayor tamaño que el de *E. coli*, sin embargo se ha encontrado que la contigüidad del ensamblado no siempre se correlaciona estrechamente con el tamaño del genoma (Paszkiwicz & Studholme, 2010). Por otro lado, los tamaños obtenidos de los genomas en este trabajo se correlacionan con los esperados. De esta manera, *E. coli* presenta un tamaño de genoma teórico de alrededor de 5,3 Mpb (Bergthorsson & Ochman, 1995) y *S. enterica* de 4,8 a 5,1 Mpb (Eichhorn et al., 2017).

La otra característica que permite evaluar la calidad de un ensamblado es la precisión, sin embargo, esta no es tan sencilla de determinar, ya que se correlaciona con la capacidad que tiene el conjunto de *contigs* obtenidos en presentar o contener todas las regiones que componen el genoma de un organismo (Miller et al., 2010). Teniendo en cuenta que no fue posible obtener las secuencias circularizadas de los plásmidos portadores de los genes codificantes de CTX-M-2 y CTX-M-14 se considera que se debería mejorar este parámetro de calidad. Una alternativa es mejorar la calidad del ensamblado, y de acuerdo a esto se probaron otros ensambladores (String Graph Assembler, disponible en: <https://basespace.illumina.com/> y Unicycler Assembly disponible en: <https://usegalaxy.eu/>) pero no fue posible obtener mejores resultados (datos no mostrados) a los obtenidos previamente usando SPAdes. Otra alternativa para mejorar la precisión implica secuenciar nuevamente con una metodología alternativa que permita obtener lecturas de mayor tamaño, como por ejemplo secuenciación mediante Nanoporos (MinION), y luego realizar un ensamblado híbrido entre los dos tipos de secuenciación.

Es importante destacar que determinados parámetros, tales como el N50 solo enfatizan en el tamaño de los *contigs* obtenidos, pero no poseen la capacidad para evaluar la precisión del ensamblaje. En muchos casos, existen algoritmos de ensamblado que parecen superar a otros ya que generan *contigs* de gran tamaño, con valores de N50 altos, sin embargo, producen secuencias consenso repletas de errores de reordenamiento. También, puede darse el caso opuesto donde un ensamblaje que consta de muchos *contigs* cortos podría tener una precisión muy alta, aunque los *contigs* podrían ser demasiado cortos para ser utilizados para el proceso de anotación de genes (Narzisi & Mishra, 2011). De esta manera, la calidad del ensamblado debe evaluarse encontrando un equilibrio entre contigüidad y precisión.

Se considera que fue posible obtener las secuencias casi completas de los plásmidos pN1 y pSeT97, sin embargo, en las mismas pueden observarse cierta falta de precisión lo que se deduce por la imposibilidad de obtener a estas secuencias cerradas (circularizadas). A pesar de ello cabe destacar que fue posible reconocer en ambos plásmidos a los genes responsables de conferir el fenotipo de resistencia a CTG, sus entornos genéticos, vinculados con la movilización de estos marcadores, los grupos de incompatibilidad plasmídicos y los componentes necesarios para llevar a cabo la conjugación bacteriana.

Además, se debe contemplar que las secuenciaciones que generan longitudes de lecturas cortas (75-35 pb o menos), por lo general, dificultan el proceso de ensamblado. Este detalle podría explicar en parte los inconvenientes encontrados para

poder obtener las secuencias completas de los plásmidos pN1 y pSeT97. A pesar de este hecho, se sugiere que para la mayoría de los genomas procariotas es teóricamente posible ensamblar la gran mayoría de genes a partir de lecturas cortas (Paszkievicz & Studholme, 2010).

A su vez, se destaca que una de las características más importantes que restan precisión al ensamblado es la presencia de elementos repetitivos tales como los transposones y secuencias de inserción (Paszkievicz & Studholme, 2010). En nuestros resultados fue posible obtener secuencias de inserción y transposones (TnAs3, Tn6196, ISEc63, IS4321R y IS1326) flanqueando la secuencia del integrón complejo clase 1 (que contiene al gen *bla*_{CTX-M-2}) encontrado en pN1 en el aislamiento de *E. coli* N1 y se localizaron secuencias de inserción (IS903B, ISEcp1 y IS15D) flanqueando al gen *bla*_{CTX-M14} (formando parte del posible plásmido responsable de la diseminación de el marcador de resistencia a CTG) en el aislamiento de *S. Typhimurium* 97.

4.3 Análisis bioinformático de secuencias y comparación de plásmidos

4.3.1 *E. coli* N1

Se determinó para el aislamiento N1 con resistencia disociada a CTG el secuenciotipo ST8125 correspondiente al complejo clonal CC10. Este complejo clonal se correlaciona con aislamientos *E. coli* de amplia distribución global y que han sido vinculados a *bla*_{CTX-M-15} (Adelowo et al., 2020), *bla*_{CTX-M-1} (Ben Sallem et al., 2014), *bla*_{CTX-M-14} (Valverde et al., 2009), *bla*_{CTX-M-3} y *bla*_{CTX-M-2} (van Hoek et al., 2015).

De acuerdo a la base de datos de la plataforma *EnteroBase* (consultada en octubre de 2021), el secuenciotipo ST8125 ha sido registrado en solo 4 aislamientos más, los cuales fueron obtenidos en Estados Unidos, China y Noruega entre los años 2014 y 2018. Sin embargo, cuando se consideraron las variantes en un único locus (SLV del inglés *single-locus variants*) incluidos en el CC10 se encontraron 12.835 aislamientos, mayoritariamente pertenecientes al ST10 (más del 90% de los aislamientos), los cuales fueron obtenidos y caracterizados en diversas regiones del mundo, a partir de distintas muestras de origen humano, animal y ambientales, demostrando su amplia distribución global. A su vez, es de destacar que este complejo clonal no se relaciona únicamente con aislamientos productores de BLEE (Reid et al., 2019; Yasir et al., 2018), sino también con aislamientos productores de carbapenemasas (Findlay et al., 2021; Suzuki et al., 2020).

En cuanto a los marcadores de resistencia encontrados se comprobó que la mayoría estaban asociados al plásmido pN1 y mediante un análisis más detallado se

verificó que los genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{OXA-2}, *aac(6')-Ib*, *sul1* y *qacEΔ1* formaban parte de un integrón complejo de clase 1. Este integrón posee la misma arquitectura que el conocido como *InS21* (número de acceso: AJ311891) y fue caracterizado en un aislamiento de *S. enterica* serovar *Infantis* obtenido en Argentina a fines de la década de los 90 (Di Conza et al., 2002), el cual también fue descrito en un aislamiento de *Vibrio cholerae* aislado en 1993 en la provincia de Salta (Petroni et al., 2002) y su secuencia se encuentra depositada en la base de datos *GenBank* con el número de acceso: DQ310703.1. Estos hallazgos demuestran la elevada estabilidad que tiene esta plataforma genética lo que permite que se mantenga inalterada en el tiempo, facilitando su dispersión mediante diferentes plásmidos. A su vez, este integrón ha sido ampliamente descrito en *Enterobacterales* productores de CTX-M-2 aislados en nuestro país (Arduino et al., 2002; Power et al., 2005), donde en esos momentos correspondía a la BLEE de mayor prevalencia a nivel nacional.

Los perfiles de sensibilidad obtenidos para el aislamiento N1 se correlacionan con los marcadores de resistencia detectados *in silico*. *E. coli* N1 mostró resistencia a CTX, FEP y sensibilidad a FOX, CAZ y carbapenemes lo que es consistente con las β-lactamasas detectadas. Por otro lado, mostró resistencia a GEN lo que se correlaciona con la presencia del marcador *aac(3)-IIa*, y resistencia a TMS, posiblemente debida *sul1* y *dfrA8*. También se detectó el marcador *aac(6')-Ib* el cual no es activo frente a GEN pero sí frente a otros aminoglucósidos (tobramicina, AMK, etc.) no evaluados en este estudio.

Al analizar los diferentes elementos móviles (transposones, secuencias de inserción y profagos) encontrados podemos destacar la elevada plasticidad genética que presenta este aislamiento.

Considerando que el aislamiento N1 fue obtenido de una muestra de orina, se analizaron los factores de virulencia obtenidos para evaluar si se corresponden con los que produciría una posible cepa uropatogénica. Por lo general, las cepas uropatogénicas de *E. coli* tienen más probabilidades de generar fimbrias P, de encapsularse, de producir la toxina citolítica hemolisina y de tener múltiples sistemas para la adquisición de hierro (Donnenberg, 2012). La presencia de factores de adhesión *fimH* y *afaD* aparecen asociados con una frecuencia superior al 80% y 40% respectivamente, a cepas de *E. coli* causantes de ITU (Matta-Chuquisapon et al., 2020). A su vez, el factor de adherencia *iha* también ha sido vinculado a cepas uropatogénicas (Yasir et al., 2020). Por otro lado, se encontraron los factores *iutA* y *sitA* asociados a la captación de hierro, lo cual es una característica común en cepas uropatogénicas (Terlizzi et al., 2017).

El factor *ompT*, que codifica una proteasa de membrana, ha sido descrito ampliamente en cepas uropatogénica y patogénicas extraintestinales (Boisen et al., 2020; He et al., 2015). El factor *iss* se vincula a cepas patogénicas extraintestinales, aunque su asociación a cepas uropatogénicas es baja (Johnson et al., 2008). Los factores de virulencia *iucC* y *terC* también se describieron en cepas patogénicas extraintestinales mientras que hay algunos factores que se han ligado a cepas enteropatogénicas como *sigA* y *capU* que se asocian con *E. coli* enteroagregativas, y *mchC* y *mchF* a cepas productoras de toxina Shiga (Boisen et al., 2020).

Además, se destaca que los factores *pap* (fimbria P), *papG* (adhesina), *sfaS4* (fimbria S) y *hlyA* (hemolisina) frecuentemente asociados a cepas uropatogénicas de *E. coli* (He et al., 2015) no fueron encontrados en el aislamiento N1.

Por su parte el plásmido pN1 fue caracterizado con el grupo de incompatibilidad IncA/C₂ (IncC) y mostró el secuenciotipo ST-3. Los plásmidos IncA/C constituyen un grupo de plásmidos autotransferibles y conjugativos que se encuentran en bajo número de copias y presentan rangos de tamaños que van desde 40 a 230 Kpb (Rozwandowicz et al., 2018). Estos plásmidos son responsables de la propagación de múltiples mecanismos de resistencia a antibióticos en *Enterobacterales* y se encuentran en aislamientos de origen humano como animal, de esta manera participan en la propagación global de diferentes genes que codifican para β-lactamasas distintas de *bla*_{CTX-M-2} como *bla*_{CMY-2} (Guo et al., 2014; Hiki et al., 2013) y *bla*_{NDM-1} (Walsh et al., 2011). Se han caracterizado plásmidos IncA/C que codifican enzimas BLEE, AmpC y carbapenemasas y marcadores de resistencia a otros grupos de antibióticos como sulfamidas (*sul1*, *sul2*), aminoglucósidos (*aphA1*, *aadA*, *aadB*, *strA*, *strB*, *aacC*), tetraciclinas *tet(A)*, cloranfenicol (*floR*, *catA1*) y trimetoprima (*dfrA*) (Rozwandowicz et al., 2018).

Debemos considerar que muchos de los plásmidos reportados con el grupo de incompatibilidad IncA/C fueron caracterizados con el esquema de tipificación de replicones por PCR clásico (Carattoli et al., 2005) por lo que en algunos casos no fue posible discriminar si corresponden a IncA/C₁ o IncA/C₂ al evaluar su asociación a *bla*_{CTX-M-2} u otros marcadores de resistencia (Papa-Ezdra et al., 2021).

La asociación entre plásmidos IncA/C y CTX-M-2 ha sido observada en el Reino Unido en el año 1998 en un aislamiento de *E. coli* (Hopkins et al., 2006), en Francia para aislamientos de *E. coli* obtenidos entre 1997 y 2002 (Marcade et al., 2009) y en América del Sur en diferentes aislamientos de *E. coli* obtenidos durante el año 2005 (Pallecchi et al., 2007). A su vez, en Uruguay, se describieron dos plásmidos IncA/C₂ (ST-3) portadores de *bla*_{CTX-M-2} (pUR-KP0923 y pUR-KP1025) caracterizados a

partir de aislamientos de *K. pneumoniae* obtenidos de muestras de tracto urinario de pacientes pediátricos (Papa-Ezdra et al., 2021).

Por otro lado, se comprobó que el plásmido pN1 presentó los componentes para llevar a cabo la conjugación bacteriana, codificando los sistemas T4CP, T4SS y el relaxoma (Virolle et al., 2020), lo cual se condice con el ensayo de conjugación exitoso obtenido en los resultados del capítulo 2 de este trabajo. A su vez, existe evidencia de que el sistema de movilidad detectado (MOB_{H121}) se encuentra frecuentemente asociado al grupo de incompatibilidad IncA/C (Alvarado et al., 2012) como se observa en los resultados obtenidos.

Además de los integrones y plásmidos como elementos de captación y diseminación de genes de resistencia, también aparecen los transposones como elementos móviles que presentan el potencial para propagar estos mecanismos de resistencia (Babakhani & Oloomi, 2018). Mediante el análisis bioinformático de la secuencia del plásmido pN1 fue posible la detección de diferentes transposones. Los resultados muestran que flanqueando al integrón complejo de clase 1 se encontraron transposones de la familia Tn3, secuencias de inserción de las familias IS110 e IS21, las cuales están relacionadas con la subfamilia de transposones Tn21, y el transposón Tn6196. La asociación de estos elementos móviles ha sido documentada por otros autores (Partridge, Brown, et al., 2001; Partridge et al., 2002; Partridge, Recchia, et al., 2001) donde los transposones Tn1404, Tn1696 y Tn21 son ejemplos claros de asociación a integrones clase 1 que se encuentran en plásmidos de resistencia. De igual modo, el entorno genético encontrado para los genes *bla*_{TEM-1} y *aac(3)-IIa* con la secuencia de inserción ISEc63 incompleta y las IS*Kpn11* y IS*Kpn12* en la cercanía a un integrón de clase 1 ha sido ampliamente documentado en diversos aislamientos de *Enterobacterales* (Iovleva et al., 2019; Marquez-Ortiz et al., 2017; Marquez et al., 2008).

En una región del plásmido pN1 se encontró al operón *mer* el cual confiere resistencia a compuestos de mercurio principalmente mediante la expresión de la proteína MerA o mercurio reductasa que cataliza la reducción del mercurio (II) a mercurio (0) volátil (Barkay et al., 2003). Además de MerA, los operones *mer* pueden codificar otras proteínas implicadas en la regulación, la unión a mercurio y la degradación de compuestos orgánicos de mercurio. El operón *mer* caracterizado en este plásmido presentó los genes codificantes para las proteínas MerA (mercurio reductasa), MerP (proteína periplásmica captadora de mercurio (II)), MerT, MerE y MerC (proteínas transportadoras de membrana que promueven el ingreso de los compuestos de mercurio al citoplasma) y MerD y MerR (actúan como activadores o

represores transcripcionales en presencia o ausencia de mercurio (II), respectivamente) (Boyd & Barkay, 2012). La presencia de operones *mer* ya ha sido descrita en *Enterobacterales* (Barkay et al., 2003) y no solamente asociados a plásmidos de tipo IncA/C (Carattoli et al., 2012; Fernandez-Alarcon et al., 2011; Lindsey et al., 2011) sino también a otros grupos de incompatibilidad, tales como IncHI2 e IncFIB (Ghiglione et al., 2021).

Las altas coberturas e identidades encontradas entre el plásmido pN1 caracterizado en este trabajo y los plásmidos pUR-KP0923 y pUR-KP1025 caracterizados a partir de aislamientos de *K. pneumoniae* obtenidos de ITU de pacientes pediátricos en Uruguay entre los años 2010 y 2011 (Papa-Ezdra et al., 2021) es un claro indicativo de la capacidad que tienen estos plásmidos para mantenerse y prevalecer entre aislamientos clínicos de diferentes especies y diseminar resistencia a CTG mediada por CTX-M-2. A su vez, respaldando esta idea se encontró homología con el plásmido pS21 (ST-3) obtenido de *S. Infantis*, uno de los primeros plásmidos portadores de *bla*_{CTX-M-2} descritos en Argentina entre los años 1997 y 1998 (Di Conza et al., 2002), donde se destaca la conservación del esqueleto de este plásmido ya que la principal diferencia encontrada entre pS21 y pN1 está relacionada con la adquisición, probablemente mediada por la secuencia de inserción *ISKpn13*, del operón *mer* presente en pN1.

Reforzando el concepto de la capacidad que presentan estos plásmidos para diseminar el gen que codifica a la enzima CTX-M-2, el plásmido pCR14_2 (ST-3) muy similar a pN1 presentó una elevada identidad al plásmido pS21 fue caracterizado en Estados Unidos en un aislamiento de *K. pneumoniae* obtenido en 2013 (Huang et al., 2017). A su vez, este aislamiento presenta otro plásmido (pCR14_3) que contiene al gen *bla*_{KPC-2} apoyando la idea de capitalismo genético por el cual los organismos resistentes tienden a ser más resistentes (Baquero, 2004).

4.3.2 *S. entérica* serovar Typhimurium 97

El aislamiento de *S. Typhimurium* 97 fue tipificado con el secuenciotipo ST19. Este secuenciotipo es un agente común de gastroenteritis y se encuentra diseminado a nivel global (Canals et al., 2019). Este hecho se respalda en la gran cantidad de aislamientos (n=34.974) del mismo secuenciotipo encontrados en la plataforma *Enterobase* (consultado en octubre de 2021) los cuales fueron aislados en diversas regiones del mundo y de diferentes muestras de origen humano, animal y de alimentos. Al igual que lo observado en este estudio, el secuenciotipo ST19, aparece descrito en numerosos trabajos como responsable de causar diferentes brotes

alrededor del mundo (Branchu et al., 2018; Gyomai et al., 2017; Parker et al., 2021), lo que se correlaciona con su amplia distribución mundial. Si la búsqueda se focaliza a nuestro país el número de aislamientos con el secuenciotipo ST19 en esta base de datos se reduce a 26 (incluyendo la cepa 97). Al evaluar la relación genética por SPN (*single-nucleotide polymorphisms*) (Zhou et al., 2020) que presentan estos 26 aislamientos se observa que, en general, se agrupan según el secuenciotipo ribosomal (rST) definido mediante rMLST (*Ribosomal Multilocus Sequence Typing*) y que el aislamiento *S. Typhimurium* 97 se encuentra formando parte de un *cluster* junto a otros 5 aislamientos que comparten el mismo rST: rST3484 (Figura 50).

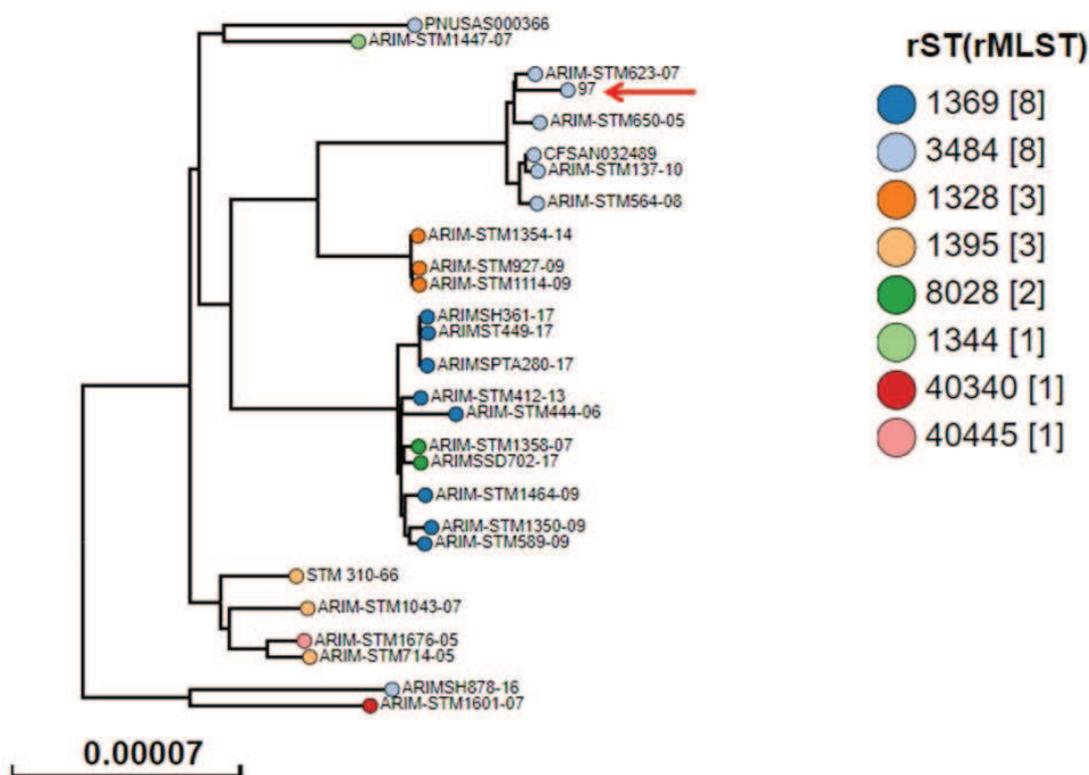


Figura 50: Dendrograma de relación genética por SPN entre los aislamientos de *S. Typhimurium* de origen nacional presentes en la plataforma *EnteroBase*. Los colores representan los diferentes secuenciotipos ribosomales (rST) caracterizados por rMLST. Al final de cada rama se indica el nombre de cada aislamiento incluido en la construcción del dendrograma. El aislamiento estudiado en este trabajo se señala con una flecha roja y presenta el código 97. La cepa PNUSAS000366 se utiliza como referencia y corresponde a un aislamiento de Estados Unidos. El dendrograma fue construido por la herramienta *SPN Project* disponible en la plataforma de *EnteroBase*. La escala utilizada representa sustituciones por sitio.

Los aislamientos ubicados en el mismo *cluster* que *S. Typhimurium* 97 (marcados en color celeste claro) pertenecientes al rST3484 son de origen humano o de alimentos y fueron aislados entre los años 2004 y 2017 en Argentina. Una observación en la misma dirección se realizó en el capítulo 1 donde el perfil de bandas

evaluado por PFGE con el aislamiento de *S. Typhimurium* 97, mostró similitud con los 2 aislamientos (de Córdoba y Neuquén), obtenidos en 2013, de muestras de materia fecal de humanos.

Al realizar el análisis del moviloma fue posible encontrar secuencias de inserción y fagos distribuidos en diversas regiones del genoma de *S. Typhimurium* 97 lo que permite destacar la elevada plasticidad genética que presenta este aislamiento.

Las SPI son grandes grupos de genes que se encuentran en los genomas de bacterias patógenas y están ausentes en cepas no patógenas de la misma especie o de especies estrechamente relacionadas. Las SPI codifican a los genes de virulencia responsables de incrementar la patogenicidad (Nieto et al., 2016). Las SPI 1 y 2 encontradas en el aislamiento estudiado son altamente conservadas y estables y se asocian al sistema de secreción necesario para la invasión del epitelio intestinal y al ataque a macrófagos y células dendríticas (Hensel, 2004). Las cepas carentes de SPI-2 son menos virulentas (Nieto et al., 2016). Por otro lado, SPI-3 presenta como principal función a la captación de magnesio por medio de la proteína MgtB (Blanc-Potard et al., 1999). La SPI-5 presenta al gen *sopB* el cual codifica una proteína que actúa como disparador de la secreción de fluidos por parte del hospedador, fenómeno que se asocia a diarrea como principal síntoma (Hensel, 2004). SPI-9 se relaciona presuntivamente con el sistema de secreción de tipo 1 (Singh et al., 2018). Finalmente, las SPI-13 y SPI-14 se corresponden con las serovariedades Gallinarum, Typhimurium y Enteritidis, aunque sus funciones son aún desconocidas (Singh et al., 2018).

En el análisis de resistoma se encontraron los marcadores de resistencia *bla*_{CTX-M-14} y *qnrB19* en *contigs* separados asociados a secuencias plasmídicas. El análisis posterior demostró que ambos están contenidos en elementos extracromosómicos diferentes. La asociación entre estos marcadores de resistencia ya ha sido informada en aislamientos de *S. Typhimurium* obtenidos en la región (Cordeiro et al., 2016). También se ha observado la asociación de CTX-M-14 a otras serovariedades a nivel regional como en *S. Enteritidis* (Bado et al., 2012). A su vez, se destaca que los aislamientos de *S. Typhimurium* productores de CTX-M-14 trascienden la región ya que también han sido reportados casos en otras partes del mundo como en Asia (Yu et al., 2011) y África (AbdelGhani et al., 2009).

El análisis de los diferentes *contigs* y su homología con secuencias alojadas en bases de datos públicas permitió suponer la presencia de al menos 3 plásmidos en el aislamiento de *S. Typhimurium* 97. El primero (pSeT97), y el de mayor interés para este trabajo, está compuesto por los *contigs* que contienen al grupo de incompatibilidad IncI1 (ST-80) y al gen *bla*_{CTX-M14}, el segundo presentado por el *contig*

17 contiene a los grupos de incompatibilidad IncFIB(s)/IncFII(s) (ST S1:A-B17) y mostró homología con plásmidos de *S. Typhimurium* alojados en base de datos que se asocian a plásmidos de virulencia previamente reportados y caracterizados para esta serovariedad (Carattoli et al., 2014) y el tercero, pQNR97 que contiene al gen *qnrB19* y el grupo de incompatibilidad Col(pHAD28) presentó 100% de identidad con pequeños plásmidos distribuidos en diferentes especies de *Enterobacterales* y en diferentes regiones de América del Sur tales como Argentina (Tran et al., 2012), Colombia (Karczmarczyk et al., 2010) y Perú (Pallecchi et al., 2010), como así también en Europa y Norteamérica (Hammerl et al., 2010; Schonfeld et al., 2021). Finalmente, en la caracterización del resistoma se encontró al gen *aac(6')-Iaa* en un *contig* vinculado a secuencias cromosómicas. Los perfiles de sensibilidad determinados para este aislamiento (ver capítulo 1) se correlacionan con los marcadores detectados *in silico*, observándose resistencia a aminopenicilinas y CTG, sensibilidad disminuida a NAL y CIP y sensibilidad a GEN y AMK lo que en principio se correlaciona con la presencia del gen *aac(6')-Iaa* el cual no tendría buena actividad en la inactivación de GEN y sólo algunas variantes presentarían actividad sobre AMK (Ramírez & Tolmasky, 2010; Salipante & Hall, 2003).

Por otro lado, se comprobó que el plásmido pSeT97 presentó los componentes para llevar a cabo la conjugación bacteriana, codificando los sistemas T4CP, T4SS y el relaxoma (Virolle et al., 2020). A su vez, existe evidencia de que el sistema de movilidad encontrado (MOB_{P12}) se encuentra frecuentemente asociado al grupo de incompatibilidad IncI1 (Alvarado et al., 2012) como se observa en los resultados obtenidos. Si bien no se realizó ensayo de conjugación en este aislamiento, los elementos genéticos detectados en pSeT97, permiten suponer que el plásmido portador de *bla*_{CTX-M-14}; sea conjugativo, como lo hemos visto en otros aislamientos de esta tesis.

Para explicar la movilización y diseminación del gen *bla*_{CTX-M-14} se estudió su entorno genético en busca de elementos transponibles, ya sean transposones o secuencias de inserción. De esta forma, se localizaron flanqueando al gen codificante de la enzima CTX-M-14 las secuencias de inserción *IS903B* completa perteneciente a familia de *IS5* y parte de la *ISEcp1* relacionada con la familia de *IS1380*. *ISEcp1* es una secuencia de inserción frecuentemente asociada a la movilización de genes codificantes de enzimas CTX-M y está ligada al pasaje de CTX-M-2 desde el cromosoma de *Kluyvera* a plásmidos (Partridge et al., 2018). La asociación de una copia incompleta de *ISEcp1* con *bla*_{CTX-M-14} ha sido anteriormente documentada (Tian et al., 2011). Otra característica de *ISEcp1* es que, aunque incompleto, presenta

intacto un promotor que es el encargado de regular la expresión del gen de resistencia asociado (Partridge et al., 2018). Por otro lado, la asociación entre genes *bla* y la secuencia de inserción IS903B está menos estudiada y son escasos los resultados que vinculan a esta IS con *bla*_{CTX-M-14} (Roshani et al., 2018). Sin embargo, el entorno genético encontrado en el plásmido pV404 es muy similar al descrito en este trabajo, donde flanqueando al gen *bla*_{CTX-M-14} se encuentra una porción de la secuencia de inserción IS*Ecp1* y al otro extremo la secuencia de inserción IS903B (Riccobono et al., 2014).

El plásmido pSeT97 mostró elevada cobertura e identidad con el plásmido pUR-EC07 caracterizado en un aislamiento de *E. coli* obtenido a partir de ITU de un paciente adulto en Uruguay en 2010 (Di Pilato et al., 2019). Este plásmido también presenta el grupo de incompatibilidad IncI1 (ST-80) y *bla*_{CTX-M-14}, pero además contiene los genes *bla*_{TEM-1} y *ermB* (vinculados a elementos genéticos móviles) que no están presentes en el plásmido pSeT97. La gran similitud entre el plásmido pUR-EC07 y el plásmido pSeT97 permite suponer un ancestro común entre ambos plásmidos, sin embargo, debemos tener en cuenta que en nuestro análisis no fue posible obtener la secuencia del plásmido cerrado, por lo que es posible que exista una región del mismo no caracterizada y que no ha sido incluida en la comparación con el plásmido pUR-EC07.

El plásmido pUR-EC07 fue encontrado en la región (América de Sur) y presentó alta cobertura e identidad con la secuencia del plásmido pSeT97 caracterizado en este trabajo. El plásmido pV404 fue caracterizado en un aislamiento de *E. coli* obtenido en el Chaco Boliviano (América de Sur), a partir de materia fecal de un niño sano (estudio epidemiológico) (Bartoloni et al., 2013), este presentó un tamaño ligeramente inferior y varios sectores con *gaps* en la secuencia al realizar el alineamiento, pero mostró la misma región en torno al gen *bla*_{CTX-M-14} y las regiones *tra* presentes en pSeT97 (Riccobono et al., 2014). Otros plásmidos que mostraron homología con el plásmido pSeT97 fueron obtenidos de aislamientos de *Enterobacterales* recuperados en Europa y China. A partir de un aislamiento de *E. coli* recuperado de heces de bovinos en Reino Unido, se caracterizó el plásmido pRHB20-C04_2 que, aunque presentó un entorno genético muy similar en la región del *bla*_{CTX-M-14}, mostró *gaps* de mayor tamaño al ser comparado con pSeT97, y también carecía de las secuencias codificantes para las proteínas TraE, TraF y TraG (Número de acceso: CP057639.1). Finalmente, el plásmido pECM13 caracterizado de un aislamiento de *E. coli*, obtenido en china a partir de una muestra de leche vacuna (Wang et al., 2017), es el que mostró menor identidad del grupo de secuencias evaluadas en este estudio. En

este caso, existe homología en las regiones *tra* encontradas pero el gen *bla*_{CTX-M-14} aparece vinculado a la secuencia de inserción IS26 y cerca presenta un integrón de clase 1 que no está presente en el plásmido pSeT97.

Todos estos plásmidos corresponden al grupo de incompatibilidad IncI1, sin embargo, el plásmido pECM13 presenta el secuenciotipo plasmídico ST-136 (Wang et al., 2017) y el plásmido pV404 muestra el secuenciotipo plasmídico ST-107 (Riccobono et al., 2014), marcando diferencias con nuestra secuencia y el plásmido pUR-EC07 (ST-80). Este análisis refuerza la hipótesis de cierta cercanía filogenética entre pUR-EC07 y pSeT97.

Finalmente, hasta donde sabemos, este trabajo representa una de las primeras caracterizaciones, aunque parcial, de un plásmido portador de *bla*_{CTX-M-14} en nuestro país asociado a un brote intranosocomial de *S. Typhimurium*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- La prevalencia de *Enterobacterales* resistentes a CTG en la ciudad de Santa Fe durante el período evaluado fue del 8,89%. Como era de esperar, *K. pneumoniae* fue la especie con mayor porcentaje de resistencia a este grupo de antibióticos. Más del 80% de esta resistencia fue debido a la presencia de BLEE.
- Las BLEE, especialmente CTX-M grupo 1 (21/60) y CTX-M grupo 2 (14/60), fueron los principales mecanismos de resistencia encontrados en *Enterobacterales*. Otras BLEE (PER-2 y CTX-M grupo 9) y enzimas AmpCp tipo CMY se describieron en menor proporción.
- La proporción de *Enterobacterales* con resistencia a carbapenemes fue de 0,44%. Fueron 3 aislamientos de *K. pneumoniae* productores de la serino-carbapenemasa KPC.
- *S. enterica* serovar Typhimurium fue la serovariedad detectada en mayor proporción con 27/39 aislamientos de Santa Fe remitidos en el año 2014 al LCPSF y, llamativamente, el 46,1 % mostró resistencia a CTG.
- En *S. enterica*, CTX-M-14 (CTX-M grupo 9) fue el principal mecanismo de resistencia a CTG, siendo la única BLEE caracterizada, seguido por un único aislamiento productor de CMY-2 (AmpCp).
- Se pudo establecer relación clonal entre 14 aislamientos de *S. Typhimurium* resistentes a CTG, los cuales fueron considerados responsables de un brote nosocomial.
- La prevalencia de resistencia disociada a CTG global en *Enterobacterales* fue de 2,2% mientras que se observó un 25% dentro del total de enterobacterias resistentes a CTG. En todos los casos se registró el mismo fenotipo CTX^R y CAZ^S. Este fenotipo se observó principalmente en aislamientos de *E. coli* y *P. mirabilis*.
- Las enzimas CTX-M-2 (CTX-M grupo 2) y CTX-M-14 (CTX-M grupo 9) fueron los principales mecanismos vinculados al fenotipo de resistencia disociada a CTG en *Enterobacterales*.

- Dos aislamientos productores de AmpC plasmídicas (CMY-2) también mostraron fenotipo de resistencia disociado a CTG.
- Se caracterizaron los plásmidos presentes en los aislamientos con fenotipo de resistencia disociada a CTG. Todos los aislamientos mostraron al menos un grupo de incompatibilidad siendo IncF (FIA, FIB, FIC o F) el de mayor prevalencia. A su vez, se observó una alta presencia de sistemas toxina-antitoxina, siendo los sistemas *hok-sok* y *ccdAB* los mayormente encontrados.
- Se evaluó la movilidad de los plásmidos presentes en los aislamientos con resistencia disociada a CTG, observándose que el 50% fue capaz de transferirse por ensayos de conjugación.
- La transferencia de los determinantes de resistencia mostró que las células que reciben CTX-M-2 o CTX-M-14 adquirirían el fenotipo disociado (CTX^R y CAZ^S), en cambio cuando se transfiere CTX-M-15 o AmpC (CMY-2) el fenotipo adquirido muestra resistencia a ambas CTG (CTX^R y CAZ^R).
- Todos los aislamientos evaluados mediante S1-PFGE mostraron al menos un plásmido (de 1 a 3 plásmidos). A partir de un análisis comparativo entre los perfiles de PFGE obtenidos para aislamientos y transconjugantes, se concluye que se obtuvo la transferencia de al menos un plásmido para cada aislamiento.
- Los tamaños de los plásmidos caracterizados y la presencia de grupos de incompatibilidad y de sistemas toxina-antitoxina muestran una elevada variabilidad entre los aislamientos estudiados.
- La presencia de sistemas de adicción en las células transconjugantes fue escasa en comparación con lo encontrado previamente en los aislamientos parentales, indicando que no todos los sistemas detectados están incluidos en los plásmidos portadores de los genes codificantes de β-lactamasas en estudio.
- Mediante curvas de cinética de muerte se observó que aquellos aislamientos que poseen como mecanismo AmpC plasmídica (CMY-2) con una CIM a CAZ sensible (4 µg/mL) no son afectados por este antibiótico, mostrando recrecimiento a las concentraciones evaluadas. Por el contrario, la utilización de FEP, muestra el

comportamiento opuesto (actividad bactericida). En contrapartida, cuando el mecanismo implicado es una BLEE (CTX-M-2 o CTX-M-14), CAZ tiene efecto bactericida y se observa recrecimiento cuando se usa FEP, tanto para las cepas parentales como en los transconjugantes a ambas concentraciones evaluadas. Este comportamiento diferencial dependiente del mecanismo de resistencia reafirma el hecho de que es muy riesgoso definir el tratamiento antibiótico basándolo solamente en los puntos de corte propuestos por el CLSI y no tener en cuenta la β -lactamasa implicada.

- La combinación CAZ más GEN mostró efecto sinérgico frente a los aislamientos estudiados productores de CMY-2 con fenotipo de resistencia disociada a CTG.

- Mediante secuenciación y análisis bioinformático del aislamiento de *E. coli* N1 con fenotipo de resistencia disociada y productor de CTX-M-2, se corroboró la presencia del gen *bla*_{CTX-M-2} previamente caracterizado.

- *E. coli* N1 se caracterizó con el secuenciotipo ST8125 (perteneciente al CC10), el serotipo O48:H32, el grupo filogenético A y los alelos *fimH-54* y *funC-11*.

- El análisis del resistoma de *E. coli* N1 mostró una plétora de genes, destacándose la presencia de *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{TEM-1} (resistencia a β -lactámicos), *aac(6')-Ib*, *aac(3)-IIa* (resistencia a aminoglucósidos), *sul1* (resistencia a sulfamidas) y *dfrA8* (resistencia a trimetoprima).

- El análisis del moviloma de *E. coli* N1 mostró la presencia de elementos extracromosómicos (plásmidos) caracterizados por los grupos de incompatibilidad IncA/C₂ (IncC) e IncI1-I, las secuencias de inserción IS609, ISEc18, IS5, ISEc31, IS421, IS26, ISKpn11, ISKpn12 e ISKpn13 y el transposón Tn6196. Además, se detectó la secuencia completa del fago 4LV2017 de *Klebsiella*.

- El análisis del viruloma de *E. coli* N1 mostró la presencia de un variado número de genes de virulencia principalmente asociados a cepas de *E. coli* patógenas extraintestinales.

- El gen *bla*_{CTX-M-2} se encontró asociado a un plásmido que pertenece al grupo de incompatibilidad A/C₂, ST-3 y contiene la relaxasa TraI, del grupo MOB_{H121}. Dicho plásmido se denominó pN1.
- Si bien la secuencia del plásmido pN1 es parcial (no se ha logrado cerrar), se obtuvo un tamaño similar al estimado mediante PFGE (160 kb).
- El plásmido pN1 presenta todos los componentes de la región que gobierna su transferencia (genes *tra*). Estos datos son compatibles con el proceso exitoso de conjugación obtenido experimentalmente.
- El plásmido pN1 mostró además del gen *bla*_{CTX-M-2} la presencia de los genes, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{TEM-1}, *aac(6')*-*Ib*, *aac(3)-IIa* y *sul1*.
- El plásmido pN1 presenta elevada identidad con plásmidos caracterizados en la región, mostrando el éxito de esta plataforma génica para prevalecer en el ambiente y generar impacto a nivel clínico, aportando resistencia en diferentes especies bacterianas. Esta conclusión se refuerza si además tenemos en cuenta que algunos de estos plásmidos autóctonos fueron aislados con más de 15 años de diferencia.
- Se observó que el gen *bla*_{CTX-M-2} en el plásmido pN1 forma parte de un integrón inusual de clase 1. Además, se pudo demostrar que este elemento genético posee gran similitud con el integrón *InS21*, presente en el plásmido pS21 de *Salmonella*. El integrón complejo clase 1 en el plásmido pN1 se encontró asociado a transposones incompletos de la familia Tn3 (*TnAs3* e *ISEc63*), al transposón completo *Tn6196* y secuencias de inserción *IS4321R* (completa) y *IS1326* (incompleta).
- El análisis de genoma completo de *S. Typhimurium* 97 perteneciente a uno de los aislamientos del brote intrahospitalario, fue tipificado con el secuenciotipo ST19 y el secuenciotipo ribosomal rST3484. Este aislamiento mostró estrecha relación filogenética con otros aislamientos, con el mismo rST, recuperados en Argentina de muestras de origen humano o de alimentos.
- En el resistoma del aislamiento de *S. Typhimurium* 97 se identificó el mismo marcador causal de la resistencia a CTG observado en el análisis retrospectivo (*bla*_{CTX-}

M-14), y a su vez, se observó la presencia otros marcadores de resistencia como *qnrB19* (fluoroquinolonas) y *aac(6')-Iaa* (aminoglucósidos).

- El análisis del moviloma de *S. Typhimurium* 97 mostró la presencia de los grupos de incompatibilidad IncI1, IncFIB(S)/IncFII(S) y Col(pHAD28) asociados a plásmidos, las secuencias de inserción *ISEcl10*, *ISSen1*, *ISVsa5*, *IS903B*, *IS682*, *ISSbo1*, *IS100* e *ISSen7* completas y fragmentos de *ISEcp1* e *IS15DI* y secuencias completas de los fagos SPN1S, ST64T, Fels-2, 118970-sal3, Gifsy-1 y Gifsy-2 de *Salmonella*.

- El análisis de las islas de patogenicidad de *S. Typhimurium* 97 mostró la presencia de diversas islas (SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-5, SPI-9, SPI-13, SPI-14, CS54 y C63PI) que refuerzan la virulencia de este patógeno.

- El gen *bla*_{CTX-M-14} se encontró, como único marcador de resistencia, asociado a un plásmido del grupo de incompatibilidad IncI1, ST-80 (CC-31), el cual presenta la relaxasa MOB_{P12} y que contiene todos los determinantes necesarios para la conjugación. Este plásmido se nombró como pSeT97.

- El entorno genético del gen *bla*_{CTX-M-14} muestra la presencia de la secuencia de inserción *IS903B* completa y porciones de las secuencias de inserción *ISEcp1* e *IS15DI*.

- El plásmido pSeT97 es la primera secuencia parcial de un plásmido portador de *bla*_{CTX-M-14} en nuestro país el cual está asociado a un aislamiento de *S. Typhimurium* recuperada de un brote intranosocomial.

- El marcador *qnrB19* se encontró localizado en un pequeño plásmido de 2.699 pb, para el cual se obtuvo su secuencia completa y presentó el grupo de incompatibilidad Col(pHAD28).

ANEXOS

ANEXOSA.1 *Buffer* TAE 50X

Composición:

2 M Tris-acetato

0,05 M EDTA

pH = 8,2 – 8,4

Esterilizar mediante vapor saturado a presión a 121°C, 15 minutos.

A.2 Caldo Luria-Bertani (LB)

Composición cada 1000 mL de medio de cultivo

Trypteina 10 g

Extracto de levadura 5 g

NaCl 10 g

Agua destilada 1000 mL

pH = 7

Esterilizar mediante vapor saturado a presión a 121°C, 15 minutos.

A.3 Caldo 2XYT

Composición cada 1000 mL de medio de cultivo

Trypteina 16 g

Extracto de levadura 10 g

NaCl 5 g

Agua destilada 1000 mL

pH = 7

Esterilizar mediante vapor saturado a presión a 121°C, 15 minutos.

A.4 *Buffer* PIV 1X

Composición:

1 M TRIS

1 M NaCl

pH 7,6

Esterilizar mediante vapor saturado a presión a 121°C, 15 minutos.

A.5 *Buffer* de Lisis 1X

Composición:

1 M TRIS

1 M NaCl

100 mM EDTA

0,2% Deoxicolato-Na

0,5% Laurilsarcosina-Na

0,5% Brij-58

pH 7,6

Esterilizar mediante vapor saturado a presión a 121°C, 15 minutos.

Al momento de uso, agregar 1 mg/mL de lisozima y 50 µg/mL ribonucleasa A.

A.6 *Buffer* ES 1X

Composición:

0,4 M EDTA

1% laurilsarcosinato-Na

pH 9.0

Esterilizar mediante vapor saturado a presión a 121°C, 15 minutos.

A.7 *Buffer* ES-P 1X

Composición:

Buffer ES+ Proteinasa K.

Preparar en el momento de su uso, según la cantidad de *plugs* a realizar.

	1 <i>plug</i>	10 <i>plugs</i>	15 <i>plugs</i>	20 <i>plugs</i>	Concentración final
<i>Buffer</i> ES	1 mL	10 mL	15 mL	20 mL	1X
Proteinasa K	0,5 mg	5 mg	7,5 mg	10 mg	0,5 mg/mL

A.8 *Buffer* TE 1X

Composición:

5 mM TRIS

5 mM EDTA

pH 7,5

Esterilizar mediante vapor saturado a presión a 121°C, 15 minutos.

A.9 Resultados de la anotación de genomas completos mediante RAST

Tabla 28: Secuencias codificantes (CDS) asociadas a sistemas según el criterio de clasificación de RAST para el aislamiento *E. coli* N1.

Sistemas	Cantidad de CDS
Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos y pigmentos	294
Pared celular y cápsula	281
Virulencia, enfermedad y defensa	127
Metabolismo del Potasio	29
Fagos, profagos, elementos transponibles y plásmidos	124
Transporte de membrana	237
Adquisición y metabolismo del hierro	50
Metabolismo del ARN	247
Nucleótidos y nucleósidos	150
Metabolismo de proteínas	300
División y ciclo celular	43
Movilidad y quimiotaxis	80
Regulación y señalización celular	167
Metabolismo secundario	27
Metabolismo del ADN	150
Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides	135
Metabolismo del nitrógeno	76
Esporulación y dormancia	5
Respiración	193
Respuesta al estrés	193
Metabolismo de compuestos aromáticos	7
Aminoácidos y derivados	394
Metabolismo del azufre	62
Metabolismo del fósforo	53
Carbohidratos	772
Varios	63
TOTAL	4259

Tabla 29: Secuencias codificantes (CDS) asociadas a sistemas según el criterio de clasificación de RAST para el aislamiento *S. entérica* serovar Typhimurium 97.

Sistemas	Cantidad de CDS
Cofactores, vitaminas, grupos prostéticos y pigmentos	309
Pared celular y cápsula	282
Virulencia, enfermedad y defensa	97
Metabolismo del Potasio	28
Fagos, profagos, elementos transponibles y plásmidos	141
Transporte de membrana	342
Adquisición y metabolismo del hierro	26
Metabolismo del ARN	259
Nucleótidos y nucleósidos	117
Metabolismo de proteínas	275
División y ciclo celular	40
Movilidad y quimiotaxis	78
Regulación y señalización celular	148
Metabolismo secundario	4
Metabolismo del ADN	138
Ácidos grasos, lípidos e isoprenoides	129
Metabolismo del nitrógeno	71
Esporulación y dormancia	3
Respiración	216
Respuesta al estrés	177
Metabolismo de compuestos aromáticos	35
Aminoácidos y derivados	442
Metabolismo del azufre	39
Metabolismo del fósforo	48
Carbohidratos	719
Varios	55
TOTAL	4218

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- AbdelGhani, S. M., Moland, E. S., Black, J. A., Hanson, N. D., Goering, R. V., Amine, M. A., . . . Thomson, K. S. (2009). First report of CTX-M-14 producing clinical isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium from Egypt. *J Infect Dev Ctries*, 4(1), 58-60. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130382>
- Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146, 837. <https://doi.org/10.1038/146837a0>
- Adelowo, O. O., Ikhimiukor, O. O., Knecht, C., Vollmers, J., Bhatia, M., Kaster, A. K., & Muller, J. A. (2020). A survey of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in urban wetlands in southwestern Nigeria as a step towards generating prevalence maps of antimicrobial resistance. *PLoS One*, 15(3), e0229451. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229451>
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., & Gupta, R. S. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 66(12), 5575-5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Akrami, F., Rajabnia, M., & Pournajaf, A. (2019). Resistance integrons; a mini review. *Caspian J Intern Med*, 10(4), 370-376. <https://doi.org/10.22088/cjim.10.4.370>
- Alvarado, A., Garcillan-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2012). A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS One*, 7(7), e40438. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040438>
- Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289(1036), 321-331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Andes, D. R., & Craig, W. A. (2012). Cefalosporinas. En G. L. Mandell, J. E. Bennett, & R. Dolin (Eds.), *Enfermedades infecciosas, principios y práctica* (7.a ed., pp. 323–340). Elsevier.
- Arduino, S. M., Catalano, M., Orman, B. E., Roy, P. H., & Centron, D. (2003). Molecular epidemiology of orf513-bearing class 1 integrons in multiresistant clinical isolates from Argentinean hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(12), 3945-3949. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3945-3949.2003>
- Arduino, S. M., Roy, P. H., Jacoby, G. A., Orman, B. E., Pineiro, S. A., & Centron, D. (2002). *bla*_{CTX-M-2} is located in an unusual class 1 integron (In35) which includes Orf513. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(7), 2303-2306. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.7.2303-2306.2002>
- Arena, F., Giani, T., Becucci, E., Conte, V., Zanelli, G., D'Andrea, M. M., . . . Rossolini, G. M. (2013). Large oligoclonal outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* ST14 and ST26 producing the FOX-7 AmpC beta-lactamase in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*, 51(12), 4067-4072. <https://doi.org/10.1128/JCM.01982-13>

- Arndt, D., Grant, J., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., & Wishart, D. S. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*, 44(Web Server issue). <https://doi.org/doi:10.1093/nar/gkw387>
- Arumugham, V. B., & Cascella, M. (2020). Third generation cephalosporins. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549881/. Último acceso 5 de octubre 2021.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., . . . Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*, 9, 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Babakhani, S., & Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol*, 58(11), 905-917. <https://doi.org/10.1002/jobm.201800204>
- Babraham Bioinformatics. (s.f.). FastQC a quality control tool for high throughput sequence data. <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Último acceso 13 de octubre 2021.
- Bado, I., Garcia-Fulgueiras, V., Cordeiro, N. F., Betancor, L., Caiata, L., Seija, V., . . . Vignoli, R. (2012). First human isolate of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis harboring *bla*_{CTX-M-14} in South America. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(4), 2132-2134. <https://doi.org/10.1128/AAC.05530-11>
- Baquero, F. (2004). From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol*, 2(6), 510-518. <https://doi.org/10.1038/nrmicro909>
- Baraniak, A., Fiett, J., Sulikowska, A., Hryniewicz, W., & Gniadkowski, M. (2002). Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(1), 151-159. <https://doi.org/10.1128/aac.46.1.151-159.2002>
- Barkay, T., Miller, S. M., & Summers, A. O. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*, 27(2-3), 355-384. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00046-9)
- Barradell, L. B., & Bryson, H. M. (1994). Cefepime. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, 47(3), 471-505. <https://doi.org/10.2165/00003495-199447030-00007>
- Bartoloni, A., Pallecchi, L., Riccobono, E., Mantella, A., Magnelli, D., Di Maggio, T., . . . Rossolini, G. M. (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(4), 356-361. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03807.x>
- Barton, B. M., Harding, G. P., & Zuccarelli, A. J. (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem*, 226(2), 235-240. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1220>
- Bassetti, M., Ginocchio, F., & Mikulska, M. (2011). New treatment options against gram-negative organisms. *Crit Care*, 15(2), 215. <https://doi.org/10.1186/cc9997>
- Bauernfeind, A., Casellas, J. M., Goldberg, M., Holley, M., Jungwirth, R., Mangold, P., . . . Wilhelm, R. (1992). A new plasmidic cefotaximase from patients infected with

- Salmonella typhimurium*. *Infection*, 20(3), 158-163.
<https://doi.org/10.1007/BF01704610>
- Bauernfeind, A., Chong, Y., & Schweighart, S. (1989). Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection*, 17(5), 316-321. <https://doi.org/10.1007/BF01650718>
- Bauernfeind, A., Grimm, H., & Schweighart, S. (1990). A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, 18(5), 294-298. <https://doi.org/10.1007/BF01647010>
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., & Giamarellou, H. (1996). Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(1), 221-224. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.1.221>
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Mangold, P., Amann, S., Akalin, E., . . . Casellas, J. (1996). Characterization of beta-lactamase gene *bla*_{PER-2}, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(3), 616-620. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.3.616>
- Bayer, A. S., Eisenstadt, R., & Morrison, J. O. (1984). Enhanced *in vitro* bactericidal activity of amikacin or gentamicin combined with three new extended-spectrum cephalosporins against cephalothin-resistant members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 25(6), 725-728. <https://doi.org/10.1128/aac.25.6.725>
- Beceiro, A., Tomas, M., & Bou, G. (2013). Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev*, 26(2), 185-230. <https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12>
- Beigverdi, R., Jabalameli, L., Jabalameli, F., & Emaneini, M. (2019). Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: First systematic review and meta-analysis from Iran. *J Glob Antimicrob Resist*, 18, 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.01.020>
- Ben Sallem, R., Ben Slama, K., Rojo-Bezares, B., Porres-Osante, N., Jouini, A., Klibi, N., . . . Torres, C. (2014). IncI1 plasmids carrying *bla*(CTX-M-1) or *bla*(CMY-2) genes in *Escherichia coli* from healthy humans and animals in Tunisia. *Microb Drug Resist*, 20(5), 495-500. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0224>
- Benko, R., Gajdacs, M., Matuz, M., Bodo, G., Lazar, A., Hajdu, E., . . . Peto, Z. (2020). Prevalence and antibiotic resistance of ESKAPE pathogens isolated in the emergency department of a tertiary care teaching hospital in Hungary: A 5-year retrospective survey. *Antibiotics (Basel)*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090624>
- Bennett, J. W., Herrera, M. L., Lewis II, J. S., Wickes, B. W., & Jorgensen, J. H. (2009). KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas putida* coinfection in a liver transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(1), 292-294. <https://doi.org/10.1128/AAC.00931-08>
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*, 153 Suppl 1, S347-357. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707607>

- Bergthorsson, U., & Ochman, H. (1995). Heterogeneity of genome sizes among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 177(20), 5784-5789. <https://doi.org/10.1128/jb.177.20.5784-5789.1995>
- Bevan, E. R., Jones, A. M., & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M beta-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother*, 72(8), 2145-2155. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx146>
- Blanc-Potard, A. B., Solomon, F., Kayser, J., & Groisman, E. A. (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol*, 181(3), 998-1004. <https://doi.org/10.1128/JB.181.3.998-1004.1999>
- Blower, T. R., Pei, X. Y., Short, F. L., Fineran, P. C., Humphreys, D. P., Luisi, B. F., & Salmond, G. P. (2011). A processed noncoding RNA regulates an altruistic bacterial antiviral system. *Nat Struct Mol Biol*, 18(2), 185-190. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1981>
- Bodey, G. P., Elting, L. S., & Rodriguez, S. (1991). Bacteremia caused by *Enterobacter*: 15 years of experience in a cancer hospital. *Rev Infect Dis*, 13(4), 550-558. <https://doi.org/10.1093/clinids/13.4.550>
- Boisen, N., Osterlund, M. T., Joensen, K. G., Santiago, A. E., Mandomando, I., Cravioto, A., . . . Nataro, J. P. (2020). Redefining enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): Genomic characterization of epidemiological EAEC strains. *PLoS Negl Trop Dis*, 14(9), e0008613. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008613>
- Bonnet, R., Sampaio, J. L., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., & Sirot, J. (2000). A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(7), 1936-1942. <https://doi.org/10.1128/aac.44.7.1936-1942.2000>
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., . . . Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*, 75(12), 3491-3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J. E., & Stokes, H. W. (2007). Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol*, 15(7), 301-309. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.05.004>
- Boyd, E. S., & Barkay, T. (2012). The mercury resistance operon: from an origin in a geothermal environment to an efficient detoxification machine. *Front Microbiol*, 3, 349. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00349>
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, 14(4), 933-951. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
- Bradford, P. A., Urban, C., Mariano, N., Projan, S. J., Rahal, J. J., & Bush, K. (1997). Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the floss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(3), 563-569. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.3.563>

- Branchu, P., Bawn, M., & Kingsley, R. A. (2018). Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infect Immun*, 86(8). <https://doi.org/10.1128/IAI.00079-18>
- Branger, C., Ledda, A., Billard-Pomares, T., Doublet, B., Fouteau, S., Barbe, V., . . . Denamur, E. (2018). Extended-spectrum beta-lactamase-encoding genes are spreading on a wide range of *Escherichia coli* plasmids existing prior to the use of third-generation cephalosporins. *Microb Genom*, 4(9). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000203>
- Bui, T., & Preuss, C. V. (2020). Cephalosporins. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/. Último acceso 5 de octubre 2021.
- Bush, K. (2010). Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Microbiol*, 13(5), 558-564. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.09.006>
- Bush, K. (2013). The ABCD's of beta-lactamase nomenclature. *J Infect Chemother*, 19(4), 549-559. <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0640-7>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3), 969-976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(6), 1211-1233. <https://doi.org/10.1128/aac.39.6.1211>
- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Canals, R., Hammarlof, D. L., Kroger, C., Owen, S. V., Fong, W. Y., Lacharme-Lora, L., . . . Hinton, J. C. D. (2019). Adding function to the genome of African *Salmonella* Typhimurium ST313 strain D23580. *PLoS Biol*, 17(1), e3000059. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000059>
- Canton, R., & Coque, T. M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*, 9(5), 466-475. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>
- Canton, R., Gonzalez-Alba, J. M., & Galan, J. C. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol*, 3, 110. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
- Canton, R., & Ruiz-Garbajosa, P. (2011). Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Curr Opin Pharmacol*, 11(5), 477-485. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.07.007>
- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(6), 2227-2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
- Carattoli, A. (2011). Plasmids in gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol*, 301(8), 654-658. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.09.003>
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*, 303(6-7), 298-304. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>

- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*, 63(3), 219-228. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018>
- Carattoli, A., Villa, L., Poirel, L., Bonnin, R. A., & Nordmann, P. (2012). Evolution of IncA/C *bla*_{CMY-(2)}-carrying plasmids by acquisition of the *bla*_{NDM-(1)} carbapenemase gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(2), 783-786. <https://doi.org/10.1128/AAC.05116-11>
- Carattoli, A., Zankari, E., Garcia-Fernandez, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., . . . Hasman, H. (2014). *In silico* detection and typing of plasmids using *PlasmidFinder* and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(7), 3895-3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
- Cardozo, M. V., Liakopoulos, A., Brouwer, M., Kant, A., Pizauro, L. J. L., Borzi, M. M., . . . de Avila, F. A. (2021). Occurrence and molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacterales* recovered from chicken, chicken meat, and human infections in Sao Paulo state, Brazil. *Front Microbiol*, 12, 628738. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628738>
- Carfi, A., Duee, E., Paul-Soto, R., Galleni, M., Frere, J. M., & Dideberg, O. (1998). X-ray structure of the ZnII beta-lactamase from *Bacteroides fragilis* in an orthorhombic crystal form. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 54(Pt 1), 45-57. <https://doi.org/10.1107/s090744499700927x>
- Casella, T., Rodriguez, M. M., Takahashi, J. T., Ghiglione, B., Dropa, M., Assuncao, E., . . . Nogueira, M. C. (2015). Detection of *bla*_{CTX-M}-type genes in complex class 1 integrons carried by *Enterobacteriaceae* isolated from retail chicken meat in Brazil. *Int J Food Microbiol*, 197, 88-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.001>
- Castanheira, M., Deshpande, L. M., Mathai, D., Bell, J. M., Jones, R. N., & Mendes, R. E. (2011). Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(3), 1274-1278. <https://doi.org/10.1128/AAC.01497-10>
- Castellanos, L. R., Donado-Godoy, P., Leon, M., Clavijo, V., Arevalo, A., Bernal, J. F., . . . Hordijk, J. (2017). High heterogeneity of *Escherichia coli* sequence types harbouring ESBL/AmpC genes on IncI1 plasmids in the Colombian poultry chain. *PLoS One*, 12(1), e0170777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170777>
- Cejas, D., Fernandez Canigia, L., Quinteros, M., Giovanakis, M., Vay, C., Lascialandare, S., . . . Radice, M. (2012). Plasmid-encoded AmpC (pAmpC) in *Enterobacteriaceae*: epidemiology of microorganisms and resistance markers. *Rev Argent Microbiol*, 44(3), 182-186. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23102467>
- Cejas, D., Magariños, F., Ferrara, M. M., Elena, A., Alfonso, C., Gutkind, G., & Radice, M. (2019). Clon de "alto riesgo" en hospital de CABA: *Klebsiella pneumoniae* ST307 productor de las carbapenemasas KPC y NDM. *XV Congreso Argentino de Microbiología (CAM 2019). 25 a 27 de septiembre de 2019 - Buenos Aires*.
- Cejas, D., Vignoli, R., Quinteros, M., Marino, R., Callejo, R., Betancor, L., . . . Radice, M. A. (2014). First detection of CMY-2 plasmid mediated beta-lactamase in

- Salmonella* Heidelberg in South America. *Rev Argent Microbiol*, 46(1), 30-33. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70044-6](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70044-6)
- Cha, M. K., Kang, C. I., Kim, S. H., Cho, S. Y., Ha, Y. E., Wi, Y. M., . . . Korean Network for Study on Infectious Diseases (KONSID). (2015). *In vitro* activities of 21 antimicrobial agents alone and in combination with aminoglycosides or fluoroquinolones against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates causing bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(9), 5834-5837. <https://doi.org/10.1128/AAC.01121-15>
- Chambers, H. F. (2012). Penicilinas e inhibidores de las β -lactamasas. En G. L. Mandell, J. E. Bennett, & R. Dolin (Eds.), *Enfermedades infecciosas, principios y práctica* (7.a ed., pp. 309–322). Elsevier.
- Chanal, C. M., Sirot, D. L., Petit, A., Labia, R., Morand, A., Sirot, J. L., & Cluzel, R. A. (1989). Multiplicity of TEM-derived beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the same hospital and relationships between the responsible plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*, 33(11), 1915-1920. <https://doi.org/10.1128/aac.33.11.1915>
- Chandrasekar, P. H., Crane, L. R., & Bailey, E. J. (1987). Comparison of the activity of antibiotic combinations *in vitro* with clinical outcome and resistance emergence in serious infection by *Pseudomonas aeruginosa* in non-neutropenic patients. *J Antimicrob Chemother*, 19(3), 321-329. <https://doi.org/10.1093/jac/19.3.321>
- Chapuis, A., Amoureux, L., Bador, J., Gavalas, A., Siebor, E., Chretien, M. L., . . . Neuwirth, C. (2016). Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter cloacae* with high MICs of quaternary ammonium compounds in a hematology ward associated with contaminated sinks. *Front Microbiol*, 7, 1070. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01070>
- Choi, S. H., Lee, J. E., Park, S. J., Choi, S. H., Lee, S. O., Jeong, J. Y., . . . Kim, Y. S. (2008). Emergence of antibiotic resistance during therapy for infections caused by *Enterobacteriaceae* producing AmpC beta-lactamase: implications for antibiotic use. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(3), 995-1000. <https://doi.org/10.1128/AAC.01083-07>
- Chow, J. W., & Yu, V. L. (1999). Combination antibiotic therapy versus monotherapy for gram-negative bacteraemia: a commentary. *Int J Antimicrob Agents*, 11(1), 7-12. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(98\)00060-0](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(98)00060-0)
- Clancy, J., Dib-Hajj, F., Petitpas, J. W., & Yuan, W. (1997). Cloning and characterization of a novel macrolide efflux gene, *mreA*, from *Streptococcus agalactiae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(12), 2719-2723. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.12.2719>
- Clancy, J., Petitpas, J., Dib-Hajj, F., Yuan, W., Cronan, M., Kamath, A. V., . . . Retsema, J. A. (1996). Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol*, 22(5), 867-879. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.01521.x>
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*, 5(1), 58-65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>

- CLSI. (2009). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Wayne, PA, USA.
- CLSI. (2010). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twentieth informational supplement. CLSI document M100-S20. Wayne, PA, USA.
- CLSI. (2020). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S30. Wayne, PA, USA.
- Codjoe, F. S., & Donkor, E. S. (2017). Carbapenem resistance: a review. *Med Sci (Basel)*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/medsci6010001>
- Conant, G. C., & Wolfe, K. H. (2008). *GenomeVx*: simple web-based creation of editable circular chromosome maps. *Bioinformatics*, 24(6), 861-862. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm598>
- Cooper, T. F., & Heinemann, J. A. (2000). Postsegregational killing does not increase plasmid stability but acts to mediate the exclusion of competing plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(23), 12643-12648. <https://doi.org/10.1073/pnas.220077897>
- Cordeiro, N. F., Nabon, A., Garcia-Fulgueiras, V., Alvez, M., Sirok, A., Camou, T., & Vignoli, R. (2016). Analysis of plasmid-mediated quinolone and oxyimino-cephalosporin resistance mechanisms in Uruguayan *Salmonella enterica* isolates from 2011-2013. *J Glob Antimicrob Resist*, 6, 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.06.002>
- Cornaglia, G., Giamarellou, H., & Rossolini, G. M. (2011). Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis*, 11(5), 381-393. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70056-1)
- Cosgrove, S. E., Kaye, K. S., Eliopoulous, G. M., & Carmeli, Y. (2002). Health and economic outcomes of the emergence of third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacter* species. *Arch Intern Med*, 162(2), 185-190. <https://doi.org/10.1001/archinte.162.2.185>
- Costa, A., & Botta, G. A. (1984). Resumption of cell division in filaments induced in *Escherichia coli* by beta lactam antibiotics possessing affinity for penicillin binding protein 3. *Drugs Exp Clin Res*, 10(11), 775-780.
- Costa, A., Calza, Y., Peña, L., Badaracco, M. E., Gutkind, G., & Di Conza, J. (2021). Aislamiento de 3 *Klebsiella pneumoniae* portadoras de KPC y NDM de un mismo paciente internado en Argentina. *XXI Congreso SADI. 25 a 27 de octubre de 2021 - Modalidad Virtual*.
- Costa, A., Figueroa-Espinosa, R., Gaudenzi, F., Lincopan, N., Fuga, B., Ghiglione, B., . . . Di Conza, J. (2021). Co-occurrence of NDM-5 and RmtB in a clinical isolate of *Escherichia coli* belonging to CC354 in Latin America. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 654852. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.654852>
- Craig, N. L. (1997). Target site selection in transposition. *Annu Rev Biochem*, 66, 437-474. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.437>

- Crump, J. A., Medalla, F. M., Joyce, K. W., Krueger, A. L., Hoekstra, R. M., Whichard, J. M., . . . Emerging Infections Program NARMS Working Group. (2011). Antimicrobial resistance among invasive nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates in the United States: National Antimicrobial Resistance Monitoring System, 1996 to 2007. *Antimicrob Agents Chemother*, *55*(3), 1148-1154. <https://doi.org/10.1128/AAC.01333-10>
- Cui, X., Zhang, H., & Du, H. (2019). Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: detection and antimicrobial therapy. *Front Microbiol*, *10*, 1823. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01823>
- Cunha, M. P., Lincopan, N., Cerdeira, L., Esposito, F., Dropa, M., Franco, L. S., . . . Knobl, T. (2017). Coexistence of CTX-M-2, CTX-M-55, CMY-2, FosA3, and QnrB19 in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from poultry in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, *61*(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02474-16>
- Dashti, A. A., Vali, L., El-Shazly, S., & Jadaon, M. M. (2014). The characterization and antibiotic resistance profiles of clinical *Escherichia coli* O25b-B2-ST131 isolates in Kuwait. *BMC Microbiol*, *14*, 214. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0214-6>
- Datta, N., & Hedges, R. W. (1971). Compatibility groups among fi - R factors. *Nature*, *234*(5326), 222-223. <https://doi.org/10.1038/234222a0>
- Datta, N., & Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature*, *208*(5007), 239-241. <https://doi.org/10.1038/208239a0>
- De Jongh, C. A., Joshi, J. H., Newman, K. A., Moody, M. R., Wharton, R., Standiford, H. C., & Schimpff, S. C. (1986). Antibiotic synergism and response in gram-negative bacteremia in granulocytopenic cancer patients. *Am J Med*, *80*(5C), 96-100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3717193>
- Dedeic-Ljubovic, A., Hukic, M., Pfeifer, Y., Witte, W., Padilla, E., Lopez-Ramis, I., & Alberti, S. (2010). Emergence of CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Bosnia and Herzegovina. *Clin Microbiol Infect*, *16*(2), 152-156. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03018.x>
- DeNap, J. C., & Hergenrother, P. J. (2005). Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria. *Org Biomol Chem*, *3*(6), 959-966. <https://doi.org/10.1039/b500182j>
- Desai, A., Marwah, V. S., Yadav, A., Jha, V., Dhaygude, K., Bangar, U., . . . Jere, A. (2013). Identification of optimum sequencing depth especially for *de novo* genome assembly of small genomes using next generation sequencing data. *PLoS One*, *8*(4), e60204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060204>
- Dhillon, R. H., & Clark, J. (2012). ESBLs: a clear and present danger? *Crit Care Res Pract*, *2012*, 625170. <https://doi.org/10.1155/2012/625170>
- Di Conza, J., Ayala, J. A., Power, P., Mollerach, M., & Gutkind, G. (2002). Novel class 1 integron (InS21) carrying *bla*_{CTX-M-2} in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *Antimicrob Agents Chemother*, *46*(7), 2257-2261. <https://doi.org/10.1128/aac.46.7.2257-2261.2002>

- Di Conza, J. A., & Gutkind, G. O. (2010). Integrones: los coleccionistas de genes. *Rev Argent Microbiol*, 42(1), 63-78. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412010000100014>
- Di Pilato, V., Papa-Ezdra, R., Chiarelli, A., Garcia-Fulgueiras, V., Pallecchi, L., & Vignoli, R. (2019). Characterization of the first *bla*_{CTX-M-14}/*ermB*-carrying IncI1 plasmid from Latin America. *Plasmid*, 102, 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.02.001>
- Diniz, W. J., & Canduri, F. (2017). Review-article bioinformatics: an overview and its applications. *Genet Mol Res*, 16(1), 1-21. <https://doi.org/10.4238/gmr16019645>
- Doi, Y., Iovleva, A., & Bonomo, R. A. (2017). The ecology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the developed world. *J Travel Med*, 24(suppl_1), S44-S51. <https://doi.org/10.1093/jtm/taw102>
- Donnenberg, M. S. (2012). *Enterobacteriaceae*. En G. L. Mandell, J. E. Bennett, & R. Dolin (Eds.), *Enfermedades infecciosas, principios y práctica* (7.a ed., pp. 2817–2836). Elsevier.
- Dunne, E. F., Fey, P. D., Kludt, P., Reporter, R., Mostashari, F., Shillam, P., . . . Angulo, F. J. (2000). Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase. *JAMA*, 284(24), 3151-3156. <https://doi.org/10.1001/jama.284.24.3151>
- Eckmann, C., Heizmann, W. R., Leitner, E., von Eiff, C., & Bodmann, K. F. (2011). Prospective, non-interventional, multi-centre trial of tigecycline in the treatment of severely ill patients with complicated infections: new insights into clinical results and treatment practice. *Chemotherapy*, 57(4), 275-284. <https://doi.org/10.1159/000329406>
- Egervarn, M., Borjesson, S., Byfors, S., Finn, M., Kaipe, C., Englund, S., & Lindblad, M. (2014). *Escherichia coli* with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and *Salmonella* on meat imported into Sweden. *Int J Food Microbiol*, 171, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.005>
- Ehmann, D. E., Jahic, H., Ross, P. L., Gu, R. F., Hu, J., Durand-Reville, T. F., . . . Fisher, S. L. (2013). Kinetics of avibactam inhibition against Class A, C, and D beta-lactamases. *J Biol Chem*, 288(39), 27960-27971. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.485979>
- Eichhorn, I., Tedin, K., & Fulde, M. (2017). Draft genome sequence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium Q1. *Genome Announc*, 5(42). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01151-17>
- Endimiani, A., Perez, F., & Bonomo, R. A. (2008). Cefepime: a reappraisal in an era of increasing antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6(6), 805-824. <https://doi.org/10.1586/14787210.6.6.805>
- Eng, S. K., Pusparajah, P., Mutalib, N.-S. A., Ser, H.-L., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front Life Sci*, 8(3), 284-293. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>

- Ewers, C., Stamm, I., Pfeifer, Y., Wieler, L. H., Kopp, P. A., Schonning, K., . . . Bethe, A. (2014). Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. *J Antimicrob Chemother*, 69(10), 2676-2680. <https://doi.org/10.1093/jac/dku217>
- Famiglietti, A., Quinteros, M., Vazquez, M., Marin, M., Nicola, F., Radice, M., . . . Subcomisión de Antimicrobianos de la Sociedad Argentina de Bacteriología Clínica (Asociación Argentina de Microbiología). (2005). Consenso sobre las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en *Enterobacteriaceae*. *Rev Argent Microbiol*, 37(1), 57-66. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15991480>
- FastQC Tutorial & FAQ. (s.f.). Research technology support facility. <https://rtsf.natsci.msu.edu/genomics/tech-notes/fastqc-tutorial-and-faq/>. Último acceso 13 de octubre 2021.
- Fernandez-Alarcon, C., Singer, R. S., & Johnson, T. J. (2011). Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. *PLoS One*, 6(8), e23415. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023415>
- Findlay, J., Poirel, L., Kessler, J., Kronenberg, A., & Nordmann, P. (2021). New Delhi metallo-beta-lactamase-producing *Enterobacterales* bacteria, Switzerland, 2019-2020. *Emerg Infect Dis*, 27(10), 2628-2637. <https://doi.org/10.3201/eid2710.211265>
- Fozo, E. M., Hemm, M. R., & Storz, G. (2008). Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72(4), 579-589, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-08>
- Fraikin, N., Goormaghtigh, F., & Van Melderen, L. (2020). Type II Toxin-Antitoxin Systems: Evolution and Revolutions. *J Bacteriol*, 202(7). <https://doi.org/10.1128/JB.00763-19>
- Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C., & de la Cruz, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev*, 28(1), 79-100. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.001>
- French, G. L. (2006). Bactericidal agents in the treatment of MRSA infections--the potential role of daptomycin. *J Antimicrob Chemother*, 58(6), 1107-1117. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl393>
- Frere, J. M., Galleni, M., Bush, K., & Dideberg, O. (2005). Is it necessary to change the classification of beta-lactamases? *J Antimicrob Chemother*, 55(6), 1051-1053. <https://doi.org/10.1093/jac/dki155>
- Fullwood, M. J., Wei, C. L., Liu, E. T., & Ruan, Y. (2009). Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. *Genome Res*, 19(4), 521-532. <https://doi.org/10.1101/gr.074906.107>
- Gales, A. C., Castanheira, M., Jones, R. N., & Sader, H. S. (2012). Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73(4), 354-360. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.007>

- García-Fernández, A., Chiaretto, G., Bertini, A., Villa, L., Fortini, D., Ricci, A., & Carattoli, A. (2008). Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *J Antimicrob Chemother*, 61(6), 1229-1233. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn131>
- García-Hernández, A. M., García-Vázquez, E., Hernández-Torres, A., Ruiz, J., Yague, G., Herrero, J. A., & Gómez, J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): Significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter*, 24(2), 57-66. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666996>
- Garcillan-Barcia, M. P., & de la Cruz, F. (2002). Distribution of IS91 family insertion sequences in bacterial genomes: evolutionary implications. *FEMS Microbiol Ecol*, 42(2), 303-313. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb01020.x>
- Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., & de la Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev*, 33(3), 657-687. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x>
- Garrod, L. P. (1957). The erythromycin group of antibiotics. *Br Med J*, 2(5036), 57-63. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5036.57>
- Gazouli, M., Tzouveleakis, L. S., Prinarakis, E., Miriagou, V., & Tzelepi, E. (1996). Transferable cefoxitin resistance in enterobacteria from Greek hospitals and characterization of a plasmid-mediated group 1 beta-lactamase (LAT-2). *Antimicrob Agents Chemother*, 40(7), 1736-1740. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.7.1736>
- Gerdes, K., Christensen, S. K., & Lobner-Olesen, A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol*, 3(5), 371-382. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1147>
- Ghaly, T. M., Chow, L., Asher, A. J., Waldron, L. S., & Gillings, M. R. (2017). Evolution of class 1 integrons: mobilization and dispersal via food-borne bacteria. *PLoS One*, 12(6), e0179169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179169>
- Ghiglione, B., Haim, M. S., Penzotti, P., Brunetti, F., D' Amico, G., Di Conza, J., . . . Dropa, M. (2021). Characterization of emerging pathogens carrying *bla*_{KPC-2} gene in IncP-6 plasmids isolated from urban sewage in Argentina. *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 722536. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.722536>
- Gilbert, D. N., & Leggett, J. E. (2012). Aminoglucósidos. En G. L. Mandell, J. E. Bennett, & R. Dolin (Eds.), *Enfermedades infecciosas, principios y práctica* (7.a ed., pp. 357–383). Elsevier.
- Girlich, D., Karim, A., Spicq, C., & Nordmann, P. (2000). Plasmid-mediated cephalosporinase ACC-1 in clinical isolates of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 19(11), 893-895. <https://doi.org/10.1007/s100960000386>
- Girlich, D., Naas, T., Bellais, S., Poirel, L., Karim, A., & Nordmann, P. (2000). Biochemical-genetic characterization and regulation of expression of an ACC-1-like chromosome-borne cephalosporinase from *Hafnia alvei*. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(6), 1470-1478. <https://doi.org/10.1128/aac.44.6.1470-1478.2000>

- Girlich, D., Poirel, L., Leelaporn, A., Karim, A., Tribuddharat, C., Fennewald, M., & Nordmann, P. (2001). Molecular epidemiology of the integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol*, 39(1), 175-182. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.1.175-182.2001>
- Gniadkowski, M., Schneider, I., Palucha, A., Jungwirth, R., Mikiewicz, B., & Bauernfeind, A. (1998). Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(4), 827-832. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.4.827>
- Goering, R. V. (2010). Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol*, 10(7), 866-875. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.023>
- Gomez, S., Rapoport, M., Togneri, A., Viegas-Caetano, J., Faccone, D., Corso, A., . . . Pasteran, F. (2011). Emergence of metallo-beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* from Argentina. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 69(1), 94-97. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.025>
- Gonzales-Escalante, E., Ruggiero, M., Cerdeira, L., Esposito, F., Fontana, H., Lincopan, N., . . . Di Conza, J. (2021). Whole-genome analysis of a high-risk clone of *Klebsiella pneumoniae* ST147 carrying both *mcr-1* and *bla*_{NDM-1} genes in Peru. *Microb Drug Resist*. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0128>
- Gonzalez Leiza, M., Perez-Diaz, J. C., Ayala, J., Casellas, J. M., Martinez-Beltran, J., Bush, K., & Baquero, F. (1994). Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(9), 2150-2157. <https://doi.org/10.1128/aac.38.9.2150>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*, 17(6), 333-351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Graesboll, K., Nielsen, S. S., Toft, N., & Christiansen, L. E. (2014). How fitness reduced, antimicrobial resistant bacteria survive and spread: a multiple pig-multiple bacterial strain model. *PLoS One*, 9(7), e100458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100458>
- Grant, J. R., & Stothard, P. (2008). The *CGView* Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acids Res*, 36(Web Server issue), W181-184. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn179>
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P. I., Bockemuhl, J., Grimont, P. A., & Weill, F. X. (2010). Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol*, 161(1), 26-29. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.10.002>
- Guo, Y. F., Zhang, W. H., Ren, S. Q., Yang, L., Lu, D. H., Zeng, Z. L., . . . Jiang, H. X. (2014). IncA/C plasmid-mediated spread of CMY-2 in multidrug-resistant *Escherichia coli* from food animals in China. *PLoS One*, 9(5), e96738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096738>

- Gupta, V., Kumarasamy, K., Gulati, N., Garg, R., Krishnan, P., & Chander, J. (2012). AmpC beta-lactamases in nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* from India. *Indian J Med Res*, 136(2), 237-241. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22960890>
- Gutkind, G. O., Di Conza, J., Power, P., & Radice, M. (2013). Beta-lactamase-mediated resistance: a biochemical, epidemiological and genetic overview. *Curr Pharm Des*, 19(2), 164-208. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22894615>
- Guzmán-Blanco, M., Labarca, J. A., Villegas, M. V., & Gotuzzo, E. (2014). Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial *Enterobacteriaceae* in Latin America. *Braz J Infect Dis*, 18(4), 421-433. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.10.005>
- Gymoese, P., Sorensen, G., Litrup, E., Olsen, J. E., Nielsen, E. M., & Torpdahl, M. (2017). Investigation of outbreaks of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variants using whole-genome sequencing, Denmark. *Emerg Infect Dis*, 23(10), 1631-1639. <https://doi.org/10.3201/eid2310.161248>
- Habboush, Y., & Guzman, N. (2020). Antibiotic resistance. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/. Último acceso 5 de octubre 2021.
- Haenni, M., Saras, E., Metayer, V., Medaille, C., & Madec, J. Y. (2014). High prevalence of *bla*_{CTX-M-1}/*IncI1*/ST3 and *bla*_{CMY-2}/*IncI1*/ST2 plasmids in healthy urban dogs in France. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(9), 5358-5362. <https://doi.org/10.1128/AAC.02545-14>
- Hall, R. M., & Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol*, 15(4), 593-600. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02368.x>
- Hall, R. M., & Collis, C. M. (1998). Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat*, 1(2), 109-119. [https://doi.org/10.1016/s1368-7646\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/s1368-7646(98)80026-5)
- Hammerl, J. A., Beutlich, J., Hertwig, S., Mevius, D., Threlfall, E. J., Helmuth, R., & Guerra, B. (2010). pSGI15, a small ColE-like *qnrB19* plasmid of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain carrying *Salmonella* genomic island 1 (SGI1). *J Antimicrob Chemother*, 65(1), 173-175. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp383>
- Hammoudi Halat, D., & Ayoub Moubareck, C. (2020). The current burden of carbapenemases: review of significant properties and dissemination among gram-negative bacteria. *Antibiotics (Basel)*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040186>
- Hanson, N. D., Moland, E. S., Hong, S. G., Propst, K., Novak, D. J., & Cavalieri, S. J. (2008). Surveillance of community-based reservoirs reveals the presence of CTX-M, imported AmpC, and OXA-30 beta-lactamases in urine isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a U.S. community. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(10), 3814-3816. <https://doi.org/10.1128/AAC.00877-08>
- Harmer, C. J., & Hall, R. M. (2015). The A to Z of A/C plasmids. *Plasmid*, 80, 63-82. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2015.04.003>

- Hawkey, P. M., Warren, R. E., Livermore, D. M., McNulty, C. A. M., Enoch, D. A., Otter, J. A., & Wilson, A. P. R. (2018). Treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria: report of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy/Healthcare Infection Society/British Infection Association Joint Working Party. *J Antimicrob Chemother*, 73(suppl_3), iii2-iii78. <https://doi.org/10.1093/jac/dky027>
- Hayes, F., & Van Melder, L. (2011). Toxins-antitoxins: diversity, evolution and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 46(5), 386-408. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.600437>
- He, X. L., Wang, Q., Peng, L., Qu, Y. R., Puthiyakunnon, S., Liu, X. L., . . . Huang, S. H. (2015). Role of uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane protein T in pathogenesis of urinary tract infection. *Pathog Dis*, 73(3). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv006>
- Heizmann, W. R., Loschmann, P. A., Eckmann, C., von Eiff, C., Bodmann, K. F., & Petrik, C. (2015). Clinical efficacy of tigecycline used as monotherapy or in combination regimens for complicated infections with documented involvement of multiresistant bacteria. *Infection*, 43(1), 37-43. <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0691-4>
- Helms, M., Ethelberg, S., Molbak, K., & DT104 study group. (2005). International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis*, 11(6), 859-867. <https://doi.org/10.3201/eid1106.041017>
- Hensel, M. (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol*, 294(2-3), 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.025>
- Hiki, M., Usui, M., Kojima, A., Ozawa, M., Ishii, Y., & Asai, T. (2013). Diversity of plasmid replicons encoding the *bla*(CMY-2) gene in broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from livestock animals in Japan. *Foodborne Pathog Dis*, 10(3), 243-249. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1306>
- Hilf, M., Yu, V. L., Sharp, J., Zuravleff, J. J., Korvick, J. A., & Muder, R. R. (1989). Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: outcome correlations in a prospective study of 200 patients. *Am J Med*, 87(5), 540-546. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(89\)80611-4](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(89)80611-4)
- Hopkins, K. L., Liebana, E., Villa, L., Batchelor, M., Threlfall, E. J., & Carattoli, A. (2006). Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(9), 3203-3206. <https://doi.org/10.1128/AAC.00149-06>
- Hordijk, J., Mevius, D. J., Kant, A., Bos, M. E., Graveland, H., Bosman, A. B., . . . Wagenaar, J. A. (2013). Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves: a longitudinal approach. *J Antimicrob Chemother*, 68(11), 2468-2476. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt219>
- Hordijk, J., Wagenaar, J. A., Kant, A., van Essen-Zandbergen, A., Dierikx, C., Veldman, K., . . . Mevius, D. (2013). Cross-sectional study on prevalence and molecular characteristics of plasmid mediated ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* isolated from veal calves at slaughter. *PLoS One*, 8(5), e65681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065681>

- Huang, W., Wang, G., Sebra, R., Zhuge, J., Yin, C., Agüero-Rosenfeld, M. E., . . . Fallon, J. T. (2017). Emergence and evolution of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* with both *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M} integrated in the chromosome. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(7). <https://doi.org/10.1128/AAC.00076-17>
- Huddleston, J. R. (2014). Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. *Infect Drug Resist*, 7, 167-176. <https://doi.org/10.2147/IDR.S48820>
- Huletsky, A., Couture, F., & Levesque, R. C. (1990). Nucleotide sequence and phylogeny of SHV-2 beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 34(9), 1725-1732. <https://doi.org/10.1128/aac.34.9.1725>
- Illumina: Read length recommendations. (s.f.). Sequencing read length. How to calculate NGS read length. <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/read-length.html/>. Último acceso 13 de octubre 2021.
- Iovleva, A., Mettus, R. T., McElheny, C. L., Mustapha, M. M., Van Tyne, D., Shields, R. K., . . . Doi, Y. (2019). Reduced ceftazidime and ertapenem susceptibility due to production of OXA-2 in *Klebsiella pneumoniae* ST258. *J Antimicrob Chemother*, 74(8), 2203-2208. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz183>
- Irrgang, A., Falgenhauer, L., Fischer, J., Ghosh, H., Guiral, E., Guerra, B., . . . Kasbohrer, A. (2017). CTX-M-15-producing *E. coli* isolates from food products in Germany are mainly associated with an IncF-type plasmid and belong to two predominant clonal *E. coli* lineages. *Front Microbiol*, 8, 2318. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02318>
- Ishii, Y., Ohno, A., Taguchi, H., Imajo, S., Ishiguro, M., & Matsuzawa, H. (1995). Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 39(10), 2269-2275. <https://doi.org/10.1128/aac.39.10.2269>
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 22(1), 161-182, Table of Contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
- Jacoby, G. A., & Sutton, L. (1991). Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 35(1), 164-169. <https://doi.org/10.1128/aac.35.1.164>
- Jahn, M., Vorpahl, C., Hubschmann, T., Harms, H., & Müller, S. (2016). Copy number variability of expression plasmids determined by cell sorting and Droplet Digital PCR. *Microb Cell Fact*, 15(1), 211. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0610-8>
- Jiménez Pearson, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., . . . Melano, R. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Rev Panam Salud Pública*, 43, 1-8. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>
- Joensen, K. G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R. S., Nielsen, E. M., & Aarestrup, F. M. (2014). Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 52(5), 1501-1510. <https://doi.org/10.1128/JCM.03617-13>

- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., & Scheutz, F. (2015). Rapid and easy *in silico* serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *J Clin Microbiol*, 53(8), 2410-2426. <https://doi.org/10.1128/JCM.00008-15>
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2021). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: *MobileElementFinder*. *J Antimicrob Chemother*, 76(1), 101-109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y. M., & Nolan, L. K. (2008). Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 74(8), 2360-2369. <https://doi.org/10.1128/AEM.02634-07>
- Jones, C. H., Tuckman, M., Keeney, D., Ruzin, A., & Bradford, P. A. (2009). Characterization and sequence analysis of extended-spectrum-beta-lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(2), 465-475. <https://doi.org/10.1128/AAC.00883-08>
- Jones, R. N. (1985). Review of the *in vitro* spectrum of activity of imipenem. *Am J Med*, 78(6A), 22-32. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(85\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(85)90098-1)
- Jure, M. A., Aulet, O., Trejo, A., & Castillo, M. (2010). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Oranienburg (CTX-M-2 group) in a pediatric hospital in Tucuman, Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop*, 43(2), 121-124. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822010000200003>
- Jure, M. A., Presti, C., Cudmani, N. M., Grellet, L. M., Lopez, C., Musa, E. H., . . . de Castillo, M. C. (2011). β -lactamasas AmpC plasmidicas tipo CMY-2 emergentes en Tucuman, Argentina. *Rev Argent Microbiol*, 43(1), 24-27. <https://doi.org/10.1590/S0325-75412011000100005>
- Kado, C. I., & Liu, S. T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol*, 145(3), 1365-1373. <https://doi.org/10.1128/JB.145.3.1365-1373.1981>
- Kali, A., Srirangaraj, S., Kumar, S., Divya, H. A., Kalyani, A., & Umadevi, S. (2013). Detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units. *Australas Med J*, 6(12), 686-693. <https://doi.org/10.4066/AMJ.2013.1824>
- Kang, C. I., Cha, M. K., Kim, S. H., Wi, Y. M., Chung, D. R., Peck, K. R., . . . Song, J. H. (2014). Extended-spectrum cephalosporins and the inoculum effect in tests with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: potential clinical implications of the revised CLSI interpretive criteria. *Int J Antimicrob Agents*, 43(5), 456-459. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.01.030>
- Kang, C. I., Pai, H., Kim, S. H., Kim, H. B., Kim, E. C., Oh, M. D., & Choe, K. W. (2004). Cefepime and the inoculum effect in tests with *Klebsiella pneumoniae* producing plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*, 54(6), 1130-1133. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh462>

- Karczmarczyk, M., Martins, M., McCusker, M., Mattar, S., Amaral, L., Leonard, N., . . . Fanning, S. (2010). Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* food and animal isolates from Colombia: identification of a *qnrB19*-mediated quinolone resistance marker in two novel serovars. *FEMS Microbiol Lett*, 313(1), 10-19. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02119.x>
- Kliebe, C., Nies, B. A., Meyer, J. F., Tolxdorff-Neutzling, R. M., & Wiedemann, B. (1985). Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, 28(2), 302-307. <https://doi.org/10.1128/aac.28.2.302>
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., & Mitsuhashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofuran, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11(6), 315-317. <https://doi.org/10.1007/BF01641355>
- Kotapati, S., Kuti, J. L., Nightingale, C. H., & Nicolau, D. P. (2005). Clinical implications of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* on cefepime effectiveness. *J Infect*, 51(3), 211-217. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2005.01.005>
- Ktari, S., Arlet, G., Mnif, B., Gautier, V., Mahjoubi, F., Ben Jmeaa, M., . . . Hammami, A. (2006). Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo-beta-lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase, and CMY-4 AmpC beta-lactamase in a Tunisian university hospital. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(12), 4198-4201. <https://doi.org/10.1128/AAC.00663-06>
- Lagace-Wiens, P. R., Tailor, F., Simner, P., DeCorby, M., Karlowsky, J. A., Walkty, A., . . . Zhanel, G. G. (2011). Activity of NXL104 in combination with beta-lactams against genetically characterized *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing class A extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(5), 2434-2437. <https://doi.org/10.1128/AAC.01722-10>
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Lukjancenko, O., Saputra, D., Rasmussen, S., Hasman, H., . . . Lund, O. (2014). Benchmarking of methods for genomic taxonomy. *J Clin Microbiol*, 52(5), 1529-1539. <https://doi.org/10.1128/JCM.02981-13>
- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., . . . Lund, O. (2012). Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*, 50(4), 1355-1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Lascols, C., Peirano, G., Hackel, M., Laupland, K. B., & 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(1), 130-136. <https://doi.org/10.1128/AAC.01686-12>
- Le-Vo, H. N., Tran, P. T., Le, L., Matsumoto, Y., Motooka, D., Nakamura, S., . . . Cao, V. (2019). Complex class 1 integron in a clinical *Escherichia coli* strain from Vietnam carrying both *mcr-1* and *bla_{NDM-1}*. *Front Microbiol*, 10, 2472. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02472>

- Leber, A. (2016). Antimicrobial susceptibility testing. En *Clinical microbiology procedures handbook* (4th ed., p. 5.14.2.1–5.14.3.6). American Society for Microbiology.
- Lederberg, J., & Tatum, E. L. (1946). Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature*, *158*(4016), 558. <https://doi.org/10.1038/158558a0>
- Lee, C. H., Su, L. H., Tang, Y. F., & Liu, J. W. (2006). Treatment of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia with carbapenems or flomoxef: a retrospective study and laboratory analysis of the isolates. *J Antimicrob Chemother*, *58*(5), 1074-1077. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl381>
- Lee, N. Y., Lee, C. C., Huang, W. H., Tsui, K. C., Hsueh, P. R., & Ko, W. C. (2013). Cefepime therapy for monomicrobial bacteremia caused by cefepime-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: MIC matters. *Clin Infect Dis*, *56*(4), 488-495. <https://doi.org/10.1093/cid/cis916>
- Leggett, R. M., Ramirez-Gonzalez, R. H., Clavijo, B. J., Waite, D., & Davey, R. P. (2013). Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics. *Front Genet*, *4*, 288. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00288>
- Legrand, P., Fournier, G., Bure, A., Jarlier, V., Nicolas, M. H., Decre, D., . . . Philippon, A. (1989). Detection of extended broad-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in four French hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *8*(6), 527-529. <https://doi.org/10.1007/BF01967473>
- Lepiae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Dreze, P., & Van Melderens, L. (2011). Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. *Nucleic Acids Res*, *39*(13), 5513-5525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr131>
- Lespada, M. I., Cordova, E., Roca, V., Gomez, N., Badia, M., & Rodriguez, C. (2018). Bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC. Estudio comparativo y evolución en 7 años. *Rev Esp Quimioter*, *32*(1), 15-21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30512080>
- Leverstein-van Hall, M. A., Dierikx, C. M., Cohen Stuart, J., Voets, G. M., van den Munckhof, M. P., van Essen-Zandbergen, A., . . . Mevius, D. J. (2011). Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect*, *17*(6), 873-880. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x>
- Liakopoulos, A., Mevius, D., & Ceccarelli, D. (2016). A review of SHV extended-spectrum beta-lactamases: neglected yet ubiquitous. *Front Microbiol*, *7*, 1374. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01374>
- Liao, X. P., Xia, J., Yang, L., Li, L., Sun, J., Liu, Y. H., & Jiang, H. X. (2015). Characterization of CTX-M-14-producing *Escherichia coli* from food-producing animals. *Front Microbiol*, *6*, 1136. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01136>
- Lim, H. M., Pene, J. J., & Shaw, R. W. (1988). Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. *J Bacteriol*, *170*(6), 2873-2878. <https://doi.org/10.1128/jb.170.6.2873-2878.1988>

- Lima, L. M., Silva, B., Barbosa, G., & Barreiro, E. J. (2020). Beta-lactam antibiotics: an overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem*, 208, 112829. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>
- Lin, M. F., Liou, M. L., Kuo, C. H., Lin, Y. Y., Chen, J. Y., & Kuo, H. Y. (2019). Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of *Proteus mirabilis* isolates from three hospitals in northern Taiwan. *Microb Drug Resist*, 25(9), 1338-1346. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0066>
- Lindsey, R. L., Frye, J. G., Fedorka-Cray, P. J., & Meinersmann, R. J. (2011). Microarray-based analysis of IncA/C plasmid-associated genes from multidrug-resistant *Salmonella enterica*. *Appl Environ Microbiol*, 77(19), 6991-6999. <https://doi.org/10.1128/AEM.00567-11>
- Liu, X. Q., & Liu, Y. R. (2016). Detection and genotype analysis of AmpC beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from tertiary hospitals. *Exp Ther Med*, 12(1), 480-484. <https://doi.org/10.3892/etm.2016.3295>
- Livermore, D. M. (1995). Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, 8(4), 557-584. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.4.557-584.1995>
- Lopatkin, A. J., Meredith, H. R., Srimani, J. K., Pfeiffer, C., Durrett, R., & You, L. (2017). Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. *Nat Commun*, 8(1), 1689. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01532-1>
- Lucero, C., Tuduri, E., Menocal, A., de Mendieta, J. M., & Pasterán, F. (2019). *Salmonella* sp.: perfil de sensibilidad a los antimicrobianos 2010-2017. Programa nacional de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, Red WHONET - Argentina. XV Congreso Argentino de Microbiología (CAM 2019). 25 a 27 de septiembre de 2019 - Buenos Aires.
- Lucet, J. C., Chevret, S., Decre, D., Vanjak, D., Macrez, A., Bedos, J. P., . . . Regnier, B. (1996). Outbreak of multiply resistant *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit: epidemiology and risk factors for acquisition. *Clin Infect Dis*, 22(3), 430-436. <https://doi.org/10.1093/clinids/22.3.430>
- Luscombe, N., Greenbaum, D., & Gerstein, M. (2001). What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods Inf Med*, 40, 346-358. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1634431>
- Ma, L., Ishii, Y., Ishiguro, M., Matsuzawa, H., & Yamaguchi, K. (1998). Cloning and sequencing of the gene encoding Toho-2, a class A beta-lactamase preferentially inhibited by tazobactam. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(5), 1181-1186. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.5.1181>
- Manzur, A., Tubau, F., Pujol, M., Calatayud, L., Dominguez, M. A., Pena, C., . . . Ariza, J. (2007). Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit. *J Clin Microbiol*, 45(8), 2365-2369. <https://doi.org/10.1128/JCM.02546-06>
- Marcade, G., Deschamps, C., Boyd, A., Gautier, V., Picard, B., Branger, C., . . . Arlet, G. (2009). Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, 63(1), 67-71. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn428>

- Marcano, D., Pasteran, F., Rapoport, M., Faccone, D., Ugarte, C., Salgado, N., . . . Sanchez, D. (2008). First isolation of a VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from a seven-year-old child in Venezuela. *J Infect Dev Ctries*, 2(3), 241-244. <https://doi.org/10.3855/jidc.270>
- Marchisio, M., Porto, A., Joris, R., Rico, M., Baroni, M. R., & Di Conza, J. (2015). Susceptibility to beta-lactams and quinolones of *Enterobacteriaceae* isolated from urinary tract infections in outpatients. *Braz J Microbiol*, 46(4), 1155-1159. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140880>
- Marquez-Ortiz, R. A., Haggerty, L., Sim, E. M., Duarte, C., Castro-Cardozo, B. E., Beltran, M., . . . Petty, N. K. (2017). First complete *Providencia rettgeri* genome sequence, the NDM-1-producing clinical strain RB151. *Genome Announc*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01472-16>
- Marquez, C., Labbate, M., Raymondo, C., Fernandez, J., Gestal, A. M., Holley, M., . . . Stokes, H. W. (2008). Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *J Clin Microbiol*, 46(10), 3417-3425. <https://doi.org/10.1128/JCM.00835-08>
- Martínez Rojas, D. D. V. (2009). Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. *Rev Soc Venez Microbiol*, 29(2), 78-83. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199414957003>
- Masi, M., Refregiers, M., Pos, K. M., & Pages, J. M. (2017). Mechanisms of envelope permeability and antibiotic influx and efflux in gram-negative bacteria. *Nat Microbiol*, 2, 17001. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.1>
- Matagne, A., Lamotte-Brasseur, J., & Frere, J. M. (1998). Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J*, 330 (Pt 2), 581-598. <https://doi.org/10.1042/bj3300581>
- Matta-Chuquisapon, J., Valencia-Bazalar, E., Marocho-Chahuayo, L., Gonzales-Escalante, E., & Sevilla-Andrade, C. R. (2020). Presencia de genes *fimH* y *afa* en aislamientos urinarios de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido en Lima, Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 37(2), 282-286. <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2020.372.4829>
- McArthur, A. G., Wagglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., . . . Wright, G. D. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(7), 3348-3357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13>
- Medeiros, A., Mayer, K., & Opal, S. (1988). Plasmid-mediated beta-lactamases. *Antimicrob Nexsl*, 5, 61-65. [https://doi.org/10.1016/0738-1751\(88\)90026-3](https://doi.org/10.1016/0738-1751(88)90026-3)
- Medvedev, P., Stanciu, M., & Brudno, M. (2009). Computational methods for discovering structural variation with next-generation sequencing. *Nat Methods*, 6(11 Suppl), S13-20. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1374>
- Meini, S., Tascini, C., Cei, M., Sozio, E., & Rossolini, G. M. (2019). AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacterales*: what a clinician should know. *Infection*, 47(3), 363-375. <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01291-9>

- Melano, R., Corso, A., Petroni, A., Centron, D., Orman, B., Pereyra, A., . . . Galas, M. (2003). Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother*, *52*(1), 36-42. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg281>
- Méndez, E. (2012). Tesis doctoral: Actividad bacteriostática y bactericida de antibióticos betalactámicos y glucopéptidos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* de importancia clínica. Caracterización genotípica de aislamientos tolerantes. *Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral*. Santa Fe, Argentina. Disponible en: <http://hdl.handle.net/11185/449>.
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, *11*(1), 31-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Migliavacca, R., Nucleo, E., D'Andrea, M. M., Spalla, M., Giani, T., & Pagani, L. (2007). Acquired AmpC type beta-lactamases: an emerging problem in Italian long-term care and rehabilitation facilities. *New Microbiol*, *30*(3), 295-298. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17802913>
- Miller, J. R., Koren, S., & Sutton, G. (2010). Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics*, *95*(6), 315-327. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.03.001>
- Minami, S., Akama, M., Araki, H., Watanabe, Y., Narita, H., Iyobe, S., & Mitsuhashi, S. (1996). Imipenem and cephem resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying plasmids coding for class B beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*, *37*(3), 433-444. <https://doi.org/10.1093/jac/37.3.433>
- Miranda, G., Kelly, C., Solorzano, F., Leanos, B., Coria, R., & 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*(12), 3138-3141. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.12.3138-3141.1996>
- Mnif, B., Harhour, H., Jdidi, J., Mahjoubi, F., Genel, N., Arlet, G., & Hammami, A. (2013). Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Tunisia and characterization of their virulence factors and plasmid addiction systems. *BMC Microbiol*, *13*, 147. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-147>
- Mnif, B., Vimont, S., Boyd, A., Bourit, E., Picard, B., Branger, C., . . . Arlet, G. (2010). Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*, *65*(8), 1599-1603. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq181>
- Monte, D. F., Mem, A., Fernandes, M. R., Cerdeira, L., Esposito, F., Galvao, J. A., . . . Landgraf, M. (2017). Chicken meat as a reservoir of colistin-resistant *Escherichia coli* strains carrying *mcr-1* genes in South America. *Antimicrob Agents Chemother*, *61*(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.02718-16>
- Moquet, O., Bouchiat, C., Kinana, A., Seck, A., Arouna, O., Bercion, R., . . . Garin, B. (2011). Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. *Emerg Infect Dis*, *17*(1), 143-144. <https://doi.org/10.3201/eid1701.100244>

- Morales-Lopez, S., Yepes, J. A., Prada-Herrera, J. C., & Torres-Jimenez, A. (2019). Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. *J Infect Dev Ctries*, 13(4), 265-273. <https://doi.org/10.3855/jidc.11216>
- Moura, A., Soares, M., Pereira, C., Leitao, N., Henriques, I., & Correia, A. (2009). INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics*, 25(8), 1096-1098. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp105>
- Moura, Q., Fernandes, M. R., Silva, K. C., Monte, D. F., Esposito, F., Dropa, M., . . . Lincopan, N. (2018). Virulent nontyphoidal *Salmonella* producing CTX-M and CMY-2 beta-lactamases from livestock, food and human infection, Brazil. *Virulence*, 9(1), 281-286. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1279779>
- Munch, K., Munch, R., Biedendieck, R., Jahn, D., & Muller, J. (2019). Evolutionary model for the unequal segregation of high copy plasmids. *PLoS Comput Biol*, 15(3), e1006724. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006724>
- Munday, C. J., Boyd, D. A., Brenwald, N., Miller, M., Andrews, J. M., Wise, R., . . . Hawkey, P. M. (2004). Molecular and kinetic comparison of the novel extended-spectrum beta-lactamases CTX-M-25 and CTX-M-26. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(12), 4829-4834. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4829-4834.2004>
- Munoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., Schwaber, M. J., Daikos, G. L., Cormican, M., . . . Quinn, J. P. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*, 13(9), 785-796. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7)
- Muñoz, V., Vacafior, L., Olocco, C., & Aguirre, A. (2019). Enterobacterias productoras de carbapenemasa en el hospital San Roque de Córdoba (2010-2017). *Presencia Bioquímica*, Marzo, 5-12.
- Muthurandhi Sethuvel, D. P., Anandan, S., Devanga Ragupathi, N. K., Veeraraghavan, B., Vinod, O., & Walia, K. (2015). Association of *bla*_{CTX-M-15} and *qnr* genes in multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium and *Shigella* spp. from India. *J Infect Dev Ctries*, 9(11), 1294-1297. <https://doi.org/10.3855/jidc.6965>
- Nakano, R., Nakano, A., Abe, M., Inoue, M., & Okamoto, R. (2012). Regional outbreak of CTX-M-2 beta-lactamase-producing *Proteus mirabilis* in Japan. *J Med Microbiol*, 61(Pt 12), 1727-1735. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.049726-0>
- Narzisi, G., & Mishra, B. (2011). Comparing *de novo* genome assembly: the long and short of it. *PLoS One*, 6(4), e19175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019175>
- Naseer, U., Haldorsen, B., Simonsen, G. S., & Sundsfjord, A. (2010). Sporadic occurrence of CMY-2-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* of ST-complexes 38 and 448, and ST131 in Norway. *Clin Microbiol Infect*, 16(2), 171-178. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02861.x>
- Navarro, F., Miro, E., & Mirelis, B. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 28(9), 638-645. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.05.002>

- Nieto, P. A., Pardo-Roa, C., Salazar-Echegarai, F. J., Tobar, H. E., Coronado-Arrazola, I., Riedel, C. A., . . . Bueno, S. M. (2016). New insights about excisable pathogenicity islands in *Salmonella* and their contribution to virulence. *Microbes Infect*, 18(5), 302-309. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.02.001>
- Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med*, 18(5), 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.03.003>
- Nordmann, P., Mariotte, S., Naas, T., Labia, R., & Nicolas, M. H. (1993). Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(5), 939-946. <https://doi.org/10.1128/aac.37.5.939>
- Nordmann, P., Poirel, L., Toleman, M. A., & Walsh, T. R. (2011). Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother*, 66(4), 689-692. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq520>
- Nordmann, P., Ronco, E., Naas, T., Duport, C., Michel-Briand, Y., & Labia, R. (1993). Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(5), 962-969. <https://doi.org/10.1128/aac.37.5.962>
- Novick, W. J., Jr. (1982). Levels of cefotaxime in body fluids and tissues: a review. *Rev Infect Dis*, 4 Suppl, S346-353. https://doi.org/10.1093/clinids/4.supplement_2.s346
- Oliver, A., Perez-Diaz, J. C., Coque, T. M., Baquero, F., & Canton, R. (2001). Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(2), 616-620. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.2.616-620.2001>
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., . . . Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), D206-214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>
- Pai, H., Choi, E. H., Lee, H. J., Hong, J. Y., & Jacoby, G. A. (2001). Identification of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol*, 39(10), 3747-3749. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3747-3749.2001>
- Pai, H., Kang, C. I., Byeon, J. H., Lee, K. D., Park, W. B., Kim, H. B., . . . Choe, K. W. (2004). Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(10), 3720-3728. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3720-3728.2004>
- Pallecchi, L., Bartoloni, A., Fiorelli, C., Mantella, A., Di Maggio, T., Gamboa, H., . . . Rossolini, G. M. (2007). Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(8), 2720-2725. <https://doi.org/10.1128/AAC.00026-07>

- Pallecchi, L., Riccobono, E., Sennati, S., Mantella, A., Bartalesi, F., Trigoso, C., . . . Rossolini, G. M. (2010). Characterization of small ColE-like plasmids mediating widespread dissemination of the *qnrB19* gene in commensal enterobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, *54*(2), 678-682. <https://doi.org/10.1128/AAC.01160-09>
- Pan, W., Wanamaker, S. I., Ah-Fong, A. M. V., Judelson, H. S., & Lonardi, S. (2018). Novo&Stitch: accurate reconciliation of genome assemblies via optical maps. *Bioinformatics*, *34*(13), i43-i51. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty255>
- Pandey, D. P., & Gerdes, K. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Res*, *33*(3), 966-976. <https://doi.org/10.1093/nar/gki201>
- Pandey, N., & Cascella, M. (2020). Beta-lactam antibiotics. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/. Último acceso 5 de octubre 2021.
- Papa-Ezdra, R., Cordeiro, N. F., Di Pilato, V., Chiarelli, A., Pallecchi, L., Garcia-Fulgueiras, V., & Vignoli, R. (2021). Description of novel resistance islands harbouring *bla*_{CTX-M-2} in IncC type 2 plasmids. *J Glob Antimicrob Resist*, *26*, 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.03.031>
- Papagiannitsis, C. C., Tzouveleakis, L. S., Tzelepi, E., & Miriagou, V. (2007). Plasmid-encoded ACC-4, an extended-spectrum cephalosporinase variant from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, *51*(10), 3763-3767. <https://doi.org/10.1128/AAC.00389-07>
- Parker, C. T., Huynh, S., Alexander, A., Oliver, A. S., & Cooper, K. K. (2021). Genomic characterization of *Salmonella* Typhimurium DT104 strains associated with cattle and beef products. *Pathogens*, *10*(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens10050529>
- Partridge, S. R. (2011). Analysis of antibiotic resistance regions in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, *35*(5), 820-855. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x>
- Partridge, S. R., Brown, H. J., Stokes, H. W., & Hall, R. M. (2001). Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother*, *45*(4), 1263-1270. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1263-1270.2001>
- Partridge, S. R., Collis, C. M., & Hall, R. M. (2002). Class 1 integron containing a new gene cassette, *aadA10*, associated with Tn1404 from R151. *Antimicrob Agents Chemother*, *46*(8), 2400-2408. <https://doi.org/10.1128/aac.46.8.2400-2408.2002>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*, *31*(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Partridge, S. R., Recchia, G. D., Stokes, H. W., & Hall, R. M. (2001). Family of class 1 integrons related to In4 from Tn1696. *Antimicrob Agents Chemother*, *45*(11), 3014-3020. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.3014-3020.2001>
- Pasteran, F. G., Otaegui, L., Guerriero, L., Radice, G., Maggiora, R., Rapoport, M., . . . Galas, M. (2008). *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires,

- Argentina. *Emerg Infect Dis*, 14(7), 1178-1180.
<https://doi.org/10.3201/eid1407.070826>
- Paszkiwicz, K., & Studholme, D. J. (2010). *De novo* assembly of short sequence reads. *Brief Bioinform*, 11(5), 457-472. <https://doi.org/10.1093/bib/bbq020>
- Patel, G., & Bonomo, R. A. (2013). "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol*, 4, 48.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00048>
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 18(4), 657-686.
<https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
- Paterson, D. L., Ko, W., Von Gottberg, A., Casellas, J. M., Mulazimoglu, L., Klugman, K. P., . . . Yu, V. L. (2001). Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*, 39(6), 2206-2212. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2206-2212.2001>
- Paterson, D. L., Singh, N., Rihs, J. D., Squier, C., Rihs, B. L., & Muder, R. R. (2001). Control of an outbreak of infection due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a liver transplantation unit. *Clin Infect Dis*, 33(1), 126-128. <https://doi.org/10.1086/320882>
- Paterson, D. L., & Yu, V. L. (1999). Extended-spectrum beta-lactamases: a call for improved detection and control. *Clin Infect Dis*, 29(6), 1419-1422.
<https://doi.org/10.1086/313559>
- Pavez, M., Neves, P., Dropa, M., Matte, M. H., Grinbaum, R. S., Elmor de Araujo, M. R., . . . Lincopan, N. (2008). Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC beta-lactamase in Brazil. *J Med Microbiol*, 57(Pt 12), 1590-1592. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/002774-0>
- Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2019). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: update on molecular epidemiology and treatment options. *Drugs*, 79(14), 1529-1541. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01180-3>
- Peña, C., Pujol, M., Ardanuy, C., Ricart, A., Pallares, R., Linares, J., . . . Gudiol, F. (1998). Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(1), 53-58.
<https://doi.org/10.1128/AAC.42.1.53>
- Perez-Perez, F. J., & Hanson, N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 40(6), 2153-2162. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.6.2153-2162.2002>
- Petroni, A., Corso, A., Melano, R., Cacace, M. L., Bru, A. M., Rossi, A., & Galas, M. (2002). Plasmidic extended-spectrum beta-lactamases in *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(5), 1462-1468.
<https://doi.org/10.1128/aac.46.5.1462-1468.2002>
- Pevsner, J. (2015). *Bioinformatics and functional genomics* (3rd Revised ed.). Wiley-Blackwell.

- Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(1), 1-11. <https://doi.org/10.1128/aac.46.1.1-11.2002>
- Philippon, A., Labia, R., & Jacoby, G. (1989). Extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 33(8), 1131-1136. <https://doi.org/10.1128/aac.33.8.1131>
- Pires, J., Taracila, M., Bethel, C. R., Doi, Y., Kasraian, S., Tinguely, R., . . . Endimiani, A. (2015). *In vivo* evolution of CMY-2 to CMY-33 beta-lactamase in *Escherichia coli* sequence type 131: characterization of an acquired extended-spectrum AmpC conferring resistance to cefepime. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(12), 7483-7488. <https://doi.org/10.1128/AAC.01804-15>
- Poirel, L., Castanheira, M., Carrer, A., Rodriguez, C. P., Jones, R. N., Smayevsky, J., & Nordmann, P. (2011). OXA-163, an OXA-48-related class D beta-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(6), 2546-2551. <https://doi.org/10.1128/AAC.00022-11>
- Poirel, L., Decousser, J. W., & Nordmann, P. (2003). Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*(CTX-M) beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(9), 2938-2945. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2938-2945.2003>
- Poirel, L., Heritier, C., Tolun, V., & Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(1), 15-22. <https://doi.org/10.1128/aac.48.1.15-22.2004>
- Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2008). Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect*, 14 Suppl 1, 75-81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01865.x>
- Poirel, L., Potron, A., & Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*, 67(7), 1597-1606. <https://doi.org/10.1093/jac/dks121>
- Popoff, M. Y., Bockemuhl, J., & Hickman-Brenner, F. W. (1996). Supplement 1995 (no. 39) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*, 147(9), 765-769. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(97\)85123-6](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(97)85123-6)
- Power, P., Galleni, M., Di Conza, J., Ayala, J. A., & Gutkind, G. (2005). Description of *In116*, the first *bla*_{CTX-M-2}-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. *J Antimicrob Chemother*, 55(4), 461-465. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh556>
- Puerta-García, A., & Mateos-Rodríguez, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, 10(51), 3426-3431. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70056-1)
- Qi, Q., Kamruzzaman, M., & Iredell, J. R. (2021). The *higBA*-type toxin-antitoxin system in IncC plasmids is a mobilizable ciprofloxacin-inducible system. *mSphere*, 6(3), e0042421. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00424-21>
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 20(3), 440-458, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>

- Quinteros, M., Radice, M., Gardella, N., Rodriguez, M. M., Costa, N., Korbenfeld, D., . . . Microbiology Study, G. (2003). Extended-spectrum beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(9), 2864-2867. <https://doi.org/10.1128/aac.47.9.2864-2867.2003>
- Radstrom, P., Skold, O., Swedberg, G., Flensburg, J., Roy, P. H., & Sundstrom, L. (1994). Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol*, 176(11), 3257-3268. <https://doi.org/10.1128/jb.176.11.3257-3268.1994>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*, 13(6), 151-171. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.08.003>
- Rapoport, M., Monzani, V., Pasteran, F., Morvay, L., Faccone, D., Petroni, A., & Galas, M. (2008). CMY-2-type plasmid-mediated AmpC beta-lactamase finally emerging in Argentina. *Int J Antimicrob Agents*, 31(4), 385-387. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.11.016>
- Ravi, R. K., Walton, K., & Khosroheidari, M. (2018). MiSeq: a next generation sequencing platform for genomic analysis. *Methods Mol Biol*, 1706, 223-232. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_12
- Reid, C. J., DeMaere, M. Z., & Djordjevic, S. P. (2019). Australian porcine clonal complex 10 (CC10) *Escherichia coli* belong to multiple sublineages of a highly diverse global CC10 phylogeny. *Microb Genom*, 5(3). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000225>
- Reisbig, M. D., Hossain, A., & Hanson, N. D. (2003). Factors influencing gene expression and resistance for gram-negative organisms expressing plasmid-encoded *ampC* genes of *Enterobacter* origin. *J Antimicrob Chemother*, 51(5), 1141-1151. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg204>
- ReLAVRA-OPS. (s.f.). Antimicrobianos.com.ar. ReLAVRA. <http://antimicrobianos.com.ar/category/resistencia/relavra/>. Último acceso 5 de octubre 2021.
- Rettedal, S., Lohr, I. H., Natas, O., Giske, C. G., Sundsfjord, A., & Oymar, K. (2012). First outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Norwegian neonatal intensive care unit; associated with contaminated breast milk and resolved by strict cohorting. *APMIS*, 120(8), 612-621. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02879.x>
- Riccobono, E., Di Pilato, V., Villagran, A. L., Bartoloni, A., Rossolini, G. M., & Pallecchi, L. (2014). Complete sequence of pV404, a novel IncI1 plasmid harbouring *bla*_{CTX-M-14} in an original genetic context. *Int J Antimicrob Agents*, 44(4), 374-376. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.019>
- Richards, D. M., & Brogden, R. N. (1985). Ceftazidime. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, 29(2), 105-161. <https://doi.org/10.2165/00003495-198529020-00002>
- Robledo, I. E., Aquino, E. E., & Vazquez, G. J. (2011). Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in

- Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(6), 2968-2970. <https://doi.org/10.1128/AAC.01633-10>
- Rocha, F. R., Pinto, V. P., & Barbosa, F. C. (2016). The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: a systematic review. *Microb Drug Resist*, 22(4), 301-311. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0180>
- Rodriguez-Bano, J., Cisneros, J. M., Cobos-Trigueros, N., Fresco, G., Navarro-San Francisco, C., Gudiol, C., . . . Bou, G. (2015). Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 33(5), 337 e331-337 e321. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.11.009>
- Rodriguez-Bano, J., Gutierrez-Gutierrez, B., Machuca, I., & Pascual, A. (2018). Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev*, 31(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00079-17>
- Rodríguez-Santiago, B., & Armengol, L. (2012). Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagn Prenat*, 23(2), 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.diapre.2012.02.001>
- Roer, L., Hendriksen, R. S., Leekitcharoenphon, P., Lukjancenko, O., Kaas, R. S., Hasman, H., & Aarestrup, F. M. (2016). Is the evolution of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* linked to restriction-modification systems? *mSystems*, 1(3). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00009-16>
- Roer, L., Johannesen, T. B., Hansen, F., Stegger, M., Tchesnokova, V., Sokurenko, E., . . . Hammerum, A. M. (2018). *CHTyper*, a web tool for subtyping of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* based on the *fumC* and *fimH* alleles. *J Clin Microbiol*, 56(4). <https://doi.org/10.1128/JCM.00063-18>
- Roer, L., Tchesnokova, V., Allesoe, R., Muradova, M., Chattopadhyay, S., Ahrenfeldt, J., . . . Hasman, H. (2017). Development of a web tool for *Escherichia coli* subtyping based on *fimH* alleles. *J Clin Microbiol*, 55(8), 2538-2543. <https://doi.org/10.1128/JCM.00737-17>
- Roshani, M., Goudarzi, H., Hashemi, A., Ardebili, A., Erfanimanesh, S., & Bahramian, A. (2018). Detection of IS903, IS26 and ISEcp1 elements in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from patients with leukemia in Iran. *Jundishapur J Microbiol*, 11(12), e58929. <https://doi.org/10.5812/jjm.58929>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., . . . Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, 73(5), 1121-1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>
- RT en español. (2014). Cameron llama al mundo a unirse frente a su "mayor amenaza": Las superbacterias. <https://actualidad.rt.com/sociedad/view/132806-cameron-invocar-mundo-unirse-superbacterias/>. Último acceso 5 de octubre 2021.
- Saba Villarroel, P. M., Gutkind, G. O., Di Conza, J. A., & Radice, M. A. (2017). First survey on antibiotic resistance markers in *Enterobacteriaceae* in Cochabamba,

- Bolivia. *Rev Argent Microbiol*, 49(1), 50-54.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.002>
- Sabate, M., Tarrago, R., Navarro, F., Miro, E., Verges, C., Barbe, J., & Prats, G. (2000). Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(7), 1970-1973.
<https://doi.org/10.1128/aac.44.7.1970-1973.2000>
- Saladin, M., Cao, V. T., Lambert, T., Donay, J. L., Herrmann, J. L., Ould-Hocine, Z., . . . Arlet, G. (2002). Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett*, 209(2), 161-168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11126.x>
- Salipante, S. J., & Hall, B. G. (2003). Determining the limits of the evolutionary potential of an antibiotic resistance gene. *Mol Biol Evol*, 20(4), 653-659.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msg074>
- Salles, M. J., Zurita, J., Mejia, C., Villegas, M. V., & Latin America Working Group on Bacterial, R. (2013). Resistant gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America. *Epidemiol Infect*, 141(12), 2459-2472.
<https://doi.org/10.1017/S095026881300191X>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2^a ed., Vol. 1). Cold Spring Harbor Laboratory.
- San Millan, A. (2018). Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. *Trends Microbiol*, 26(12), 978-985.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.06.007>
- Sanders, W. E., Jr., & Sanders, C. C. (1997). *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev*, 10(2), 220-241.
<https://doi.org/10.1128/CMR.10.2.220-241.1997>
- Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum beta-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*, 8, 13. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>
- Schonfeld, J., Clark, C., Robertson, J., Arya, G., Eagle, S. H. C., Gurnik, S., . . . Nash, J. H. E. (2021). Complete genome sequences for 36 Canadian *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and I 1,4,[5],12:i:- isolates from clinical and animal sources. *Microbiol Resour Announc*, 10(1).
<https://doi.org/10.1128/MRA.00734-20>
- Sennati, S., Santella, G., Di Conza, J., Pallecchi, L., Pino, M., Ghiglione, B., . . . Gutkind, G. (2012). Changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(11), 6003-6005. <https://doi.org/10.1128/AAC.00745-12>
- SENTRY. (s.f.). Antimicrobial surveillance program. <https://sentry-mvp.jmilabs.com/app/sentry-public/heatmap/>. Último acceso 5 de octubre 2021
- Seo, K. W., Shim, J. B., & Lee, Y. J. (2019). Emergence of CMY-2-producing *Escherichia coli* in Korean layer parent stock. *Microb Drug Resist*, 25(3), 462-468. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0254>

- Serisier, D. J., Tuck, A., Matley, D., Carroll, M. P., & Jones, G. (2012). Antimicrobial susceptibility and synergy studies of cystic fibrosis sputum by direct sputum sensitivity testing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31(11), 3211-3216. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1687-6>
- Shaikh, S., Rizvi, S. M., Anis, R., & Shakil, S. (2016). Prevalence of CTX-M resistance marker and integrons among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates of clinical origin. *Lett Appl Microbiol*, 62(5), 419-427. <https://doi.org/10.1111/lam.12567>
- Shen, P., Wei, Z., Jiang, Y., Du, X., Ji, S., Yu, Y., & Li, L. (2009). Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among *Enterobacteriaceae* in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(10), 4333-4338. <https://doi.org/10.1128/AAC.00260-09>
- Sheu, C. C., Chang, Y. T., Lin, S. Y., Chen, Y. H., & Hsueh, P. R. (2019). Infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: an update on therapeutic options. *Front Microbiol*, 10, 80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00080>
- Shintani, M., Sanchez, Z. K., & Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol*, 6, 242. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00242>
- Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., & Chandler, M. (2006). *ISfinder*: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue), D32-36. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>
- Siguier, P., Gournayre, E., & Chandler, M. (2014). Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev*, 38(5), 865-891. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12067>
- Sims, D., Sudbery, I., Illott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat Rev Genet*, 15(2), 121-132. <https://doi.org/10.1038/nrg3642>
- Singh, Y., Saxena, A., Kumar, R., & Saxena, M. K. (2018). Virulence System of *Salmonella* with Special Reference to *Salmonella enterica*. En Mascellino M. T. (Ed.), *Salmonella - A Re-emerging Pathogen* (1.a ed., pp. 41–53). Intechopen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77210>
- Smalla, K., Jechalke, S., & Top, E. M. (2015). Plasmid detection, characterization, and ecology. *Microbiol Spectr*, 3(1), PLAS-0038-2014. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0038-2014>
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(3), 434-452. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-10>
- Smith, H., Bossers, A., Harders, F., Wu, G., Woodford, N., Schwarz, S., . . . Mevius, D. (2015). Characterization of epidemic IncI1-Igama plasmids harboring ambler class A and C genes in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(9), 5357-5365. <https://doi.org/10.1128/AAC.05006-14>

- Sougakoff, W., Goussard, S., & Courvalin, P. (1988). The TEM-3 beta-lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiol Lett*, *56*(3), 343-348. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1988.tb03204.x>
- Spanu, T., Luzzaro, F., Perilli, M., Amicosante, G., Toniolo, A., Fadda, G., & Italian, E. S. G. (2002). Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, *46*(1), 196-202. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.1.196-202.2002>
- Spratt, B. G. (1983). Penicillin-binding proteins and the future of beta-lactam antibiotics. The Seventh Fleming Lecture. *J Gen Microbiol*, *129*(5), 1247-1260. <https://doi.org/10.1099/00221287-129-5-1247>
- Stanke, M., & Morgenstern, B. (2005). AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucleic Acids Res*, *33*(Web Server issue), W465-467. <https://doi.org/10.1093/nar/gki458>
- Stapleton, P. J., Murphy, M., McCallion, N., Brennan, M., Cunney, R., & Drew, R. J. (2016). Outbreaks of extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in neonatal intensive care units: a systematic review. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, *101*(1), F72-78. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2015-308707>
- Sukmawinata, E., Uemura, R., Sato, W., Mitoma, S., Kanda, T., & Sueyoshi, M. (2020). IncI1 plasmid associated with bla_{CTX-M-2} transmission in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from healthy thoroughbred racehorse, Japan. *Antibiotics (Basel)*, *9*(2). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020070>
- Suzuki, Y., Nazareno, P. J., Nakano, R., Mondoy, M., Nakano, A., Bugayong, M. P., . . . Yano, H. (2020). Environmental presence and genetic characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from hospital sewage and river water in the Philippines. *Appl Environ Microbiol*, *86*(2). <https://doi.org/10.1128/AEM.01906-19>
- Sykes, R. B., Koster, W. H., & Bonner, D. P. (1988). The new monobactams: chemistry and biology. *J Clin Pharmacol*, *28*(2), 113-119. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1988.tb05734.x>
- Tait-Kamradt, A., Clancy, J., Cronan, M., Dib-Hajj, F., Wondrack, L., Yuan, W., & Sutcliffe, J. (1997). *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, *41*(10), 2251-2255. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.10.2251>
- Tamma, P. D., Cosgrove, S. E., & Maragakis, L. L. (2012). Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev*, *25*(3), 450-470. <https://doi.org/10.1128/CMR.05041-11>
- Tamma, P. D., Doi, Y., Bonomo, R. A., Johnson, J. K., Simner, P. J., & Antibacterial Resistance Leadership, G. (2019). A primer on AmpC beta-lactamases: necessary knowledge for an increasingly multidrug-resistant world. *Clin Infect Dis*, *69*(8), 1446-1455. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz173>
- Tamma, P. D., Girdwood, S. C., Gopaul, R., Tekle, T., Roberts, A. A., Harris, A. D., . . . Carroll, K. C. (2013). The use of cefepime for treating AmpC beta-lactamase-

- producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis*, 57(6), 781-788. <https://doi.org/10.1093/cid/cit395>
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Front Microbiol*, 8, 1566. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- Thomson, K. S. (2010). Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol*, 48(4), 1019-1025. <https://doi.org/10.1128/JCM.00219-10>
- Thomson, K. S., & Sanders, C. C. (1994). Dissociated resistance among fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*, 38(9), 2095-2100. <https://doi.org/10.1128/aac.38.9.2095>
- Tian, L., Zhu, X., Chen, Z., Liu, W., Li, S., Yu, W., . . . Sun, Z. (2016). Characteristics of bacterial pathogens associated with acute diarrhea in children under 5 years of age: a hospital-based cross-sectional study. *BMC Infect Dis*, 16, 253. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1603-2>
- Tian, S. F., Chu, Y. Z., Chen, B. Y., Nian, H., & Shang, H. (2011). *ISEcp1* element in association with *bla*(CTX-M) genes of *E. coli* that produce extended-spectrum beta-lactamase among the elderly in community settings. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29(10), 731-734. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.07.011>
- Tipper, D. J., & Strominger, J. L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 54(4), 1133-1141. <https://doi.org/10.1073/pnas.54.4.1133>
- Tomasz, A. (1979). The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 33, 113-137. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.33.100179.000553>
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). Beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors in the 21st century. *J Mol Biol*, 431(18), 3472-3500. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Tran, T., Andres, P., Petroni, A., Soler-Bistue, A., Albornoz, E., Zorreguieta, A., . . . Tolmasky, M. E. (2012). Small plasmids harboring *qnrB19*: a model for plasmid evolution mediated by site-specific recombination at *oriT* and *Xer* sites. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(4), 1821-1827. <https://doi.org/10.1128/AAC.06036-11>
- Travers, K., & Barza, M. (2002). Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. *Clin Infect Dis*, 34 Suppl 3, S131-134. <https://doi.org/10.1086/340251>
- Uemura, M., Imataki, O., Uchida, S., Nakayama-Imahiji, H., Ohue, Y., Matsuka, H., . . . Kadowaki, N. (2017). Strain-specific transmission in an outbreak of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in the hemato-oncology care unit: a cohort study. *BMC Infect Dis*, 17(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-2144-4>

- Una sola salud. (2021). OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal. <https://www.oie.int/es/que-hacemos/iniciativas-mundiales/una-sola-salud/>. Último acceso 5 de octubre 2021.
- Valverde, A., Canton, R., Garcillan-Barcia, M. P., Novais, A., Galan, J. C., Alvarado, A., . . . Coque, T. M. (2009). Spread of *bla*(CTX-M-14) is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(12), 5204-5212. <https://doi.org/10.1128/AAC.01706-08>
- van Hoek, A. H., Schouls, L., van Santen, M. G., Florijn, A., de Greeff, S. C., & van Duijkeren, E. (2015). Molecular characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* from humans in the community. *PLoS One*, 10(6), e0129085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129085>
- Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J. N., Lopez, J. A., Quinn, J. P., & Colombian Nosocomial Resistance Study, G. (2007). First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(4), 1553-1555. <https://doi.org/10.1128/AAC.01405-06>
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., & Lesterlin, C. (2020). Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: from the cellular to the community level. *Genes (Basel)*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/genes11111239>
- Walsh, T. R., Hall, L., Assinder, S. J., Nichols, W. W., Cartwright, S. J., MacGowan, A. P., & Bennett, P. M. (1994). Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim Biophys Acta*, 1218(2), 199-201. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(94\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0167-4781(94)90011-6)
- Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M., & Toleman, M. A. (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis*, 11(5), 355-362. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70059-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70059-7)
- Wang, X. M., Dong, Z., Schwarz, S., Zhu, Y., Hua, X., Zhang, Y., . . . Zhang, W. J. (2017). Plasmids of diverse Inc groups disseminate the fosfomycin resistance gene *fosA3* among *Escherichia coli* isolates from pigs, chickens, and dairy cows in northeast China. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(9). <https://doi.org/10.1128/AAC.00859-17>
- Waterworth, P. M., & Emmerson, A. M. (1979). Dissociated resistance among cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, 15(4), 497-503. <https://doi.org/10.1128/aac.15.4.497>
- Williamson, D. A., Roberts, S. A., Smith, M., Heffernan, H., Tiong, A., Pope, C., & Freeman, J. T. (2012). High rates of susceptibility to ceftazidime among globally prevalent CTX-M-producing *Escherichia coli*: potential clinical implications of the revised CLSI interpretive criteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31(5), 821-824. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1380-1>
- Wong, M. H., Kan, B., Chan, E. W., Yan, M., & Chen, S. (2016). IncI1 plasmids carrying various *bla*_{CTX-M} genes contribute to ceftriaxone resistance in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(2), 982-989. <https://doi.org/10.1128/AAC.02746-15>

- Woodford, N., Eastaway, A. T., Ford, M., Leanord, A., Keane, C., Quayle, R. M., . . . Livermore, D. M. (2010). Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*, *48*(8), 2999-3002. <https://doi.org/10.1128/JCM.00341-10>
- Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*, *35*(5), 736-755. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>
- Xie, Y., Wei, Y., Shen, Y., Li, X., Zhou, H., Tai, C., . . . Ou, H. Y. (2018). TADB 2.0: an updated database of bacterial type II toxin-antitoxin loci. *Nucleic Acids Res*, *46*(D1), D749-D753. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1033>
- Yang, Y. J., Wu, P. J., & Livermore, D. M. (1990). Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, *34*(5), 755-758. <https://doi.org/10.1128/aac.34.5.755>
- Yasir, M., Ajlan, A. M., Shakil, S., Jiman-Fatani, A. A., Almasaudi, S. B., Farman, M., . . . Azhar, E. I. (2018). Molecular characterization, antimicrobial resistance and clinico-bioinformatics approaches to address the problem of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in western Saudi Arabia. *Sci Rep*, *8*(1), 14847. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33093-8>
- Yasir, M., Farman, M., Shah, M. W., Jiman-Fatani, A. A., Othman, N. A., Almasaudi, S. B., . . . Azhar, E. I. (2020). Genomic and antimicrobial resistance genes diversity in multidrug-resistant CTX-M-positive isolates of *Escherichia coli* at a health care facility in Jeddah. *J Infect Public Health*, *13*(1), 94-100. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.06.011>
- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., . . . Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, *45*(4), 1151-1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
- Yip, D. W., & Gerriets, V. (2020). Penicillin. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL). Disponible en: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554560/. Último acceso 5 de octubre 2021.
- Yong, D., Choi, Y. S., Roh, K. H., Kim, C. K., Park, Y. H., Yum, J. H., . . . Chong, Y. (2006). Increasing prevalence and diversity of metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., and *Enterobacteriaceae* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*, *50*(5), 1884-1886. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1884-1886.2006>
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, *53*(12), 5046-5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
- Yoon, E. J., Choi, Y. J., Park, S. H., Shin, J. H., Park, S. G., Choi, J. R., & Jeong, S. H. (2020). A novel KPC variant KPC-55 in *Klebsiella pneumoniae* ST307 of

- reinforced meropenem-hydrolyzing activity. *Front Microbiol*, 11, 561317. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561317>
- Yu, F., Chen, Q., Yu, X., Li, Q., Ding, B., Yang, L., . . . Pan, J. (2011). High prevalence of extended-spectrum beta lactamases among *Salmonella enterica* Typhimurium isolates from pediatric patients with diarrhea in China. *PLoS One*, 6(3), e16801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016801>
- Zankari, E., Allesoe, R., Joensen, K. G., Cavaco, L. M., Lund, O., & Aarestrup, F. M. (2017). PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother*, 72(10), 2764-2768. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx217>
- Zhanel, G. G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D. J., . . . Karlowky, J. A. (2007). Comparative review of the carbapenems. *Drugs*, 67(7), 1027-1052. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767070-00006>
- Zhang, S., Yin, Y., Jones, M. B., Zhang, Z., Deatherage Kaiser, B. L., Dinsmore, B. A., . . . Deng, X. (2015). *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. *J Clin Microbiol*, 53(5), 1685-1692. <https://doi.org/10.1128/JCM.00323-15>
- Zhao, W. D., Yan, P., Guan, H. N., & Zhang, Q. Z. (2014). Characterization of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase in clinical clones of *Escherichia coli* in Southwest China. *J Basic Microbiol*, 54(3), 247-252. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200313>
- Zhao, W. H., & Hu, Z. Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 39(1), 79-101. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460>
- Zhou, Z., Alikhan, N. F., Mohamed, K., Fan, Y., Agama Study, G., & Achtman, M. (2020). The *Enterobase* user's guide, with case studies on *Salmonella* transmissions, *Yersinia pestis* phylogeny, and *Escherichia* core genomic diversity. *Genome Res*, 30(1), 138-152. <https://doi.org/10.1101/gr.251678.119>