

“CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS PORTADORES DE MECANISMOS DE RESISTENCIA DISOCIADA A CEFALOSPORINAS DE TERCERA GENERACIÓN EN ENTEROBACTERIAS”

Liebrezn Karen

Cátedra de Microbiología General, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL.

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Bioquímica

Grupo: X

Palabras clave: Plásmido, BLEE, resistencia disociada, enterobacterias.

INTRODUCCIÓN

La producción de β -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia a antibióticos β -lactámicos en bacilos gram-negativos. Estas enzimas se designan por su espectro de acción, tal es así, que aquellas que ampliaron su espectro de hidrólisis a cefalosporinas de tercera generación (CTG) se denominan β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Puerta García *et al*, 2010). Las opciones de tratamiento en las infecciones causadas por microorganismos gram-negativos productores de BLEE son limitadas, ya que presentan resistencia a CTG y cefalosporinas de cuarta generación, penicilinas de amplio espectro y aztreonam. Además los plásmidos que codifican estos marcadores portan genes de resistencia a otros antibióticos, por lo cual se genera un fenómeno de resistencia cruzada. (García-Hernández *et al*, 2011). Las BLEE más frecuentemente encontradas pertenecen a las familias CTX-M, SHV y TEM (Thomson, 2010). Las primeras CTX-M identificadas fueron capaces de conferir resistencia a cefotaxima (CTX) aunque su capacidad para hidrolizar eficientemente ceftazidima (CAZ) fue muy baja o nula (Cantón *et al*, 2012), observándose así una resistencia disociada a las CTG. Las AmpC son otro tipo de β -lactamasas; su espectro de acción no sólo incluye cefalosporinas, sino también aminopenicilinas, cefalosporinas de primera generación y cefamicinas. Las más comúnmente encontradas pertenecen a las familias CMY, FOX y DHA (Thomson 2010). Si bien los genes codificantes de β -lactamasa (*bla*) pueden localizarse en el cromosoma bacteriano, también son capaces de movilizarse e integrarse a plásmidos y transposones (Cantón *et al*, 2012), siendo estas plataformas las responsables de su diseminación. Son los plásmidos conjugativos y movilizables los que favorecen la diseminación de resistencia a antibióticos, situación que se ve incrementada debido a la elevada presión selectiva generada por la terapia antibiótica.

Un esquema formal de clasificación de plásmidos se basa en la caracterización del grupo de incompatibilidad (Inc), siendo IncK, IncB/O, IncY, IncI1, IncF, IncFIA-IncFIB, IncHI2, IncL/M e IncA/C los prevalentes asociados a plásmidos portadores de genes codificantes de β -lactamasas en *Enterobacteriaceae* (Cejas *et al*. 2012; Gomez *et al*. 2011). En general los plásmidos también codifican sistemas de adicción que se basan en los factores toxina/antitoxina. Como los genes codificantes de las toxinas y antitoxinas se encuentran en un operón dentro de la secuencia plasmídica, aquellas células que no recibieron el plásmido en cuestión, mueren por acción de la toxina (Fozo *et al*. 2008).

OBJETIVOS

- Caracterizar los plásmidos portadores de genes de resistencia a CTG, de acuerdo a su movilidad, al grupo de incompatibilidad y sistema de adicción.
- Realizar ensayos de conjugación y/o electroporación para obtener células portadoras de los plásmidos bajo estudio.
- Determinar los perfiles de sensibilidad, grupos de incompatibilidad y sistemas de adicción de los transconjugantes y electroporantes obtenidos.

METODOLOGÍA

Se estudiaron 15 aislamientos de enterobacterias previamente caracterizados, todos ellos resistentes (R) a CTX y sensibles (S) a CAZ, entre las que se encontraban: 5 *Escherichia coli* y 2 *Proteus mirabilis* con CTX-M-2; 4 *E. coli* y 1 *Klebsiella pneumoniae* con CTX-M-14; 1 *E. coli* con CTX-M-15 y 1 *E. coli* y 1 *P. mirabilis* con CMY-2.

Con la finalidad de observar la transferencia de los distintos mecanismos de resistencia, se utilizó la técnica de conjugación por *mating out* en medio sólido, según lo descrito por Sambrook en 1989, utilizando como cepas dadoras (F+) las anteriormente mencionadas y como células receptoras (F-), distintas cepas de *E. coli*: TOP10, HB101, J53b2, K12 y derivados de K12, JF700, JF701 y JF703. Los sistemas de selección que se utilizaron luego de realizada la conjugación se conformaron según la cepa receptora utilizada; para TOP10: Ceftriaxona (CRO) 0,25µg/ml y estreptomina (STR) 200µg/ml; para K12 y sus derivados: STR 200 µg/ml y CRO 1µg/ml; y para J53b2: CRO 1µg/ml, Azida y Rifampicina (RIF) 200µg/ml. Aquellos plásmidos que fueron incapaces de ser transferidos por conjugación, fueron sometidos a transformación por electroporación. La purificación de plásmidos se realizó según lo publicado por Kado y Liu en 1981, y la obtención de las células electrocompetentes y la electroporación se realizaron según lo proporcionado por Bio-rad (MicroPulser™ Catalog Number 162-2100).

Se realizaron las pruebas bioquímicas de identificación citrato, TSI (Agar-Hierro triple azúcar) y SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad), para confirmar la identidad bacteriana de las células transconjugantes. La verificación de la transferencia del ADN plasmídico se realizó mediante PCR utilizando los cebadores correspondientes para cada β-lactamasa, usando como molde ADN total obtenido mediante lisis por calor, y posterior corrida electroforética en geles de agarosa al 1%, estimándose los tamaños por medio de la comparación con marcadores de peso molecular (1 Kb y 100 bp). El perfil de sensibilidad y el fenotipo de resistencia de cada microorganismo se determinó por medio de la técnica de difusión en agar siguiendo los lineamientos del CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*), y/o por medio de la determinación de la CIM utilizando el equipo automatizado Vitek 2. La caracterización de los plásmidos según grupos de incompatibilidad y sistemas de adicción se realizaron mediante *PCR-based replicon typing* (Carattoli *et al.* 2005) y siguiendo la metodología propuesta por Mnif en 2010, respectivamente.

RESULTADOS

Se obtuvieron transconjugantes para 12 de los 15 aislamientos bajo estudio. Los aislamientos que fueron capaces de transferir los plásmidos portadores de los mecanismos de resistencia caracterizados mostraron la siguiente distribución: 3 *P. mirabilis* (C13, C21 e I9), 1 *K. pneumoniae* (I26), y 8 *E. coli* (C1, C17, I12, I27, N1, N2, N13 y N14). Las combinaciones obtenidas fueron las siguientes: la cepa HB101 con C1 y N14; TOP10 con C13, C21, I9, I26 y N1; JF700 y JF701 con N1; J53-b2 con C17, I12, I27, N2 y N13. No se pudieron obtener transconjugantes para 3 aislamientos de *E. coli* (C24, N8 y N15), ni para la célula receptora *E. coli* K-12, por lo que se intentó transferir

el plásmido mediante la técnica de electroporación, usando como cepas receptoras, *E. coli* TOP10 y HB101. Luego de varias pruebas, todos los resultados para esta técnica fueron negativos.

Al evaluar los perfiles de sensibilidad a antibióticos se pudo observar que cuando el mecanismo transferido fue una BLEE, la cepa receptora adquirió el perfil de resistencia disociada a CTG (CTX R; CAZ S); por el contrario, cuando fue transferido CMY-2, la célula F- obtuvo resistencia neta a CTG (CTX R; CAZ R). A su vez, se analizó la co-transferencia de algún marcador de resistencia a otra familia de antibióticos. Se pudo observar que *P. mirabilis* C13 (CTX-M-2), *E. coli* N1 (CTX-M-2) y *E. coli* N2 (CTX-M-15) además de transferir resistencia a CTX, pasaron a las células receptoras resistencia a gentamicina (GEN), haciendo suponer que la resistencia a este aminoglucósido estaría codificada en los mismos plásmidos.

Respecto a los grupos de incompatibilidad y sistemas de adicción se encontró que no todos los grupos y sistemas hallados en los aislamientos con resistencia disociada fueron capaces de co-transferirse junto a la β -lactamasa. Estos resultados son esperables ya que es probable que los aislamientos tengan más de un tipo de plásmido y que cada uno tenga al menos un grupo de incompatibilidad. En la tabla 1 se muestran los grupos de incompatibilidad encontrados en los aislamientos (F+) y en los transconjugantes asociados.

Tabla 1: Se puede observar los distintos grupos de incompatibilidad presentes en los aislamientos (F+) y en los transconjugantes asociados.

	Grupo de Incompatibilidad								
	A/C	FIA	FIB	FIC	I1	B/O	K	N	HI1
C13/C13-TOP10	+/+	+/-	+/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
I26/I26-TOP10	-/-	+/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
C1/C1-HB101	+/-	+/-	+/+	-/-	+/+	+/-	-/-	-/-	-/-
N1/N1-TOP10	+/+	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	-/-	+/-
N14/N14-HB101	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/-	-/-

En la tabla 2 se resume el análisis de los sistemas de adicción realizado sobre los aislamientos y los transconjugantes asociados. No todos los transconjugantes adquirieron estos sistemas, indicando que los mismos pueden estar alojados en plásmidos diferentes al portador de la β -lactamasa.

Tabla 2: Se resumen los sistemas de adicción encontrados en los aislamientos (F+) y los transconjugantes asociados.

	Sistema de adicción							
	<i>relBE</i>	<i>hok-sok</i>	<i>pndAC</i>	<i>vagCD</i>	<i>ccdAB</i>	<i>srnBC</i>	<i>penKI</i>	<i>parDE</i>
C13/C13-TOP10	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
C21/C21-TOP10	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
I9/I9-TOP10	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	-/-
I26/I26-TOP10	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
C1/C1-HB101	-/-	+/-	+/+	-/-	+/+	-/-	+/-	-/-
N1/N1-TOP10	-/-	+/+	+/+	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-

CONCLUSIONES

La transferencia horizontal de plásmidos entre los aislamientos parentales y las cepas de *E. coli* receptoras por medio de conjugación es alta. Estos resultados muestran

la facilidad que tienen los marcadores de resistencia asociados a plataformas móviles para dispersarse entre diferentes especies bacterianas.

Se observó que cuando el mecanismo de resistencia transferido es una BLEE, se visualiza un fenotipo de CTX R y CAZ S al igual que en el aislamiento dador. En cambio, cuando el mecanismo transferido fue CMY-2 los transconjugantes generados adquirieron resistencia a ambas CTG.

Analizando los perfiles de sensibilidad se pudo observar que tres aislamientos fueron capaces de transferir además de la resistencia a CTX, resistencia a GEN indicando que algún mecanismo de resistencia a aminoglucósidos se podría encontrar codificado en el plásmido transferido.

Si bien en los aislamientos clínicos parentales se encontró una gran variedad de grupos de incompatibilidad y sistemas de adicción, la transferencia de estos fue baja, dado principalmente porque la célula parental puede poseer varios tipos de plásmidos, los cuales no son transferidos en su totalidad hacia la célula receptora.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Cantón, R.; González-Alba, J.; Galán, J., 2012. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in microbiology*. 3(110), 1-19.

Carattoli, A; Bertini, A; Villa, L; Falbo, V; Hopkins, K., 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of microbiological methods*, 63(3), 219-228.

Cejas, D; Fernández Canigia, L; Quinteros, M; Giovanakis, M; Vay, C., 2012. Plasmid-Encoded AmpC (pAmpC) in *Enterobacteriaceae*: epidemiology of microorganisms and resistance markers. *Revista Argentina de Microbiología*, 44(3), 182-186.

Fozo, E; Hemm, M; y Storz, G., 2008. Small toxic proteins and the antisense RNAs that repress them. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 579-589.

Frère, J; Nguyen Distéche, M; Coyette, J y Joris, B., 1992. Mode of action: interaction with the penicillin-binding-proteins. En: Page MI, ed. *The Chemistry of β -lactams*. Glasgow, U.K.: Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall; 148197.

García-Hernández, A.; García-Vázquez, E.; Hernández-Torres, A.; Ruiz, J.; Yagüe, G.; Herrero, J.; Gómez, J., 2011. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista Española de Quimioterapia*, 2011;24(2):57-66.

Gomez, S; Pasteran, F; Faccione, D; Tijet, N; Rapoport, M., 2011. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1520-1524.

Kado, C.; Liu, S., 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*. 145(3);1365.

MicroPulser™ Catalog Number 162-2100.

Mnif, B; Vimont, S; Boyd, A; Bourit, E; Picard, B., 2010. Molecular characterization of addiction systems of plasmids encoding extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(8), 1599-1603.

Puerta García, A. y Mateos Rodríguez, F., 2010. *Enterobacterias*. *Medicine*, 10(51), 3326-3331

Sambrook, J; Fritsch, E.; Maniatis T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Thomson, K., 2010. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *Journal of clinical microbiology*, 48(4), 1019-1025.