

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



TIPIFICACION CON ENFOQUES FENOTIPICOS Y GENOTIPICOS DE
AISLAMIENTOS HOSPITALARIOS DE *Klebsiella pneumoniae*
PRODUCTORES DE LA CARBAPENEMASA KPC-2.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

PRISCILA SARAI SEVILLANO PLATERO

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE 2020

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

ASESORA DE AREA EN: CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS Y COSMETICOS

Licda Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

ASESORA DE AREA EN: MICROBIOLOGÍA

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz.

DOCENTES ASESORAS

Dra. Daniela Cejas

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su amor, dedicación y paciencia con la que cada día se preocuparon por mi avance y desarrollo de esta tesis, pues han sido ellos los principales promotores de mis sueños, gracias por confiar y creer en mí y mis expectativas.

Este trabajo de investigación fue realizado bajo la supervisión y asesoría de la Dra. Daniela Cejas quien fue mi mentora en todo este mundo de la biología molecular y MSc. Amy Morán quien me ayudo en todo el proceso de conexión con el país, les expreso mi más profundo agradecimiento por toda la orientación, paciencia, tiempo, esfuerzo y dedicación que brindaron para que este trabajo fuera realizado.

A la Universidad de Buenos Aires y el Laboratorio de Resistencia Bacteriana por recibirme y hacerme sentir como en casa, me permitieron aprender de la mejor forma “haciendo”, por el uso de los instrumentos, reactivos y equipos necesarios que todos los compañeros me explicaron las veces que fueran hasta hacerlo bien. A la Universidad de El Salvador por enviarme tan lejos con un propósito y un objetivo claro de poner en alto nuestra alma mater, el cual hoy es cumplido por la culminación de este trabajo ya que ambas Universidades sin su apertura, confianza y colaboración no hubiera sido posible.

A mis docentes del tribunal calificador: MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez, MSc. Coralía de los Ángeles González de Díaz y Licenciada Zenia Ivonne de Márquez, quienes guiaron la investigación, gracias a sus consejos, opiniones y correcciones hoy finalmente logro entregar este trabajo con la calidad que se merece.

Priscila Sevillano

DEDICATORIA

Dios, tu amor y bondad no tienen final, pues me has permitido sonreír ante todos mis logros que son el resultado de tu ayuda, este trabajo de tesis ha sido una gran bendición y una excelente forma de aprender en todos los aspectos de mi vida, gracias porque me diste la sabiduría y valentía para seguir, y me guiaste hasta cumplir uno de los anhelos más grandes de mi corazón. Mi Dios hasta aquí me has ayudado.

Le dedico este trabajo a mis padres René y Lucy quienes me forjaron como la persona que soy ahora, a mis hermanos René y Emely quienes me apoyaron de todas las formas posibles aun en los momentos más inesperados, a mis abuelos René y Amanda que siempre me dieron sus consejos de seguir adelante, a toda mi familia que está lejos pero que siempre estuvieron pendientes en diversas formas, me animaron a continuar y me apoyaron cuando más lo necesite. A Milly y Barrita por que su compañía en las largas noches de desvelos me hacía sentir mejor. A todos gracias por su amor, esfuerzo, paciencia y comprensión durante estos años. Son lo más preciado que tengo y los amo demasiado.

Le dedico este logro a todos mis amigos, los salvadoreños que siempre creyeron en mí y los amigos argentinos que forme en el proceso porque me alentaron a dar lo mejor de mí siempre. Amigos gracias a todos por sus consejos, por la ayuda y el cariño mostrado en acciones, porque sin todos los ángeles que Dios puso en mi camino nada de esto hubiera sido posible, los tengo a cada uno en mi corazón y los quiero demasiado.

Priscila Sevillano

INDICE

	Pág N°
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCION	xiii
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo General	
2.2 Objetivos Específicos	
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEÓRICO	18
3.1 Enterobacteriaceae	18
3.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
3.3 Antibióticos	20
3.4 Antibióticos β -lactámicos	20
3.5 Mecanismos de acción de los antibióticos β -lactámicos	23
3.6 Mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos	26
3.6.1 Alteraciones de la permeabilidad	26
3.6.2 Modificación de las dianas	27
3.6.3 Expresión de bombas de eliminación activa	27
3.6.4 Producción de enzimas (β -Lactamasas)	27
3.7 β -lactamasas	29
3.8 β -lactamasas en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
3.9 β -lactamasas de clase A, Carbapenemasas tipo KPC	
3.10 Métodos aplicados al estudio de tipificación con enfoques fenotípicos y genotípicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de KPC	36
3.10.1 Métodos Fenotípicos	36
3.10.2 Métodos Genotípicos	37

CAPITULO IV

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	42
4.1 Tipo de estudio	42
4.2 Investigación Bibliográfica	42
4.3 Investigación de campo	43
4.4 Parte Experimental	43
4.4.1 Identificar fenotípicamente la presencia de β -lactamasas de tipo KPC mediante ensayos de difusión en medio sólido.	46
4.4.2 Detectar los genes codificantes de KPC (bla_{KPC}) en los aislamientos en estudio mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	48
4.4.3 Establecer posibles relaciones de clonalidad entre los microorganismos productores de KPC, mediante la utilización de enzimas de restricción del genoma en conjunto con electroforesis de campo pulsado (PFGE) y por medio de tipificación multilocus de secuencias (MLST).	53
4.4.4 Determinar los elementos genéticos involucrados en la diseminación horizontal de resistencia, a través del estudio de la asociación a elementos genéticos móviles como transposones y la tipificación de los plásmidos portadores de bla_{KPC-2} .	59

CAPITULO V

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	68
5.1 Identificar fenotípicamente la presencia de β -lactamasas de tipo KPC mediante ensayos de difusión en medio sólido.	72

5.2	Detectar los genes codificantes de KPC (<i>bla_{KPC}</i>) en los aislamientos en estudio mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	73
5.3	Establecer posibles relaciones de clonalidad entre los microorganismos productores de KPC, mediante la utilización de enzimas de restricción del genoma en conjunto con electroforesis de campo pulsado (PFGE) y por medio de tipificación multilocus de secuencias (MLST).	77
5.4	Determinar los elementos genéticos involucrados en la diseminación horizontal de resistencia, a través del estudio de la asociación a elementos genéticos móviles como transposones y la tipificación de los plásmidos portadores de <i>bla_{KPC-2}</i> .	81
5.5	Entrevista realizada en las unidades relacionados con la verificación de la resistencia bacteriana en centros de salud o investigación en el departamento de San Salvador	92
5.6	Publicaciones científicas y presentaciones en congresos	97
CAPITULO VI		
6.0	CONCLUSIONES	100
CAPITULO VII		
7.0	RECOMENDACIONES	102
BIBLIOGRAFIA		
ANEXOS		

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
BLEA	β -lactamasas de espectro ampliado.
BLEE	β -lactamasas de espectro extendido.
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio)
CONICET	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates (Desoxirribonucleótido trifosfato)
GOES	Gobierno de El Salvador.
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasa.
MIC	Concentración Inhibitoria Mínima.
MLST	Multilocus sequence typing (Tipificación multilocus de secuencias).
NCBI	National Center for Biotechnology Information. (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards (Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico)
OMS	Organización Mundial de la Salud.
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (Electroforesis de campo pulsado)
RELAVRA	Red Latinoamericana de Vigilancia de las Resistencias a los Antimicrobianos.
RAM	Resistencia Antimicrobiana.

SHV	Sulphydryl variable, (Tipo de enzima de espectro extendido)
ST	Secuencio Tipo.
TEM	Temoniera, (Tipo de enzima de espectro extendido)
MEM	Meropenem.
IPM	Imipenem.

RESUMEN

El problema de la resistencia a los antimicrobianos supone una amenaza a la medicina moderna a nivel mundial y a la sostenibilidad de una respuesta eficaz de la salud pública frente a las enfermedades infecciosas. El tratamiento de las infecciones provocadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de la carbapenemasa de tipo KPC ha sido reportado como un problema global.

El objetivo de la presente investigación fue la tipificación de 19 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productores de la carbapenemasa KPC-2, provenientes del Hospital Alemán de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina, utilizando enfoques fenotípicos y genotípicos. A su vez, este trabajo buscaba conocer el estado actual de las unidades relacionadas con la verificación de la resistencia bacteriana en centros de salud o investigación de San Salvador, a través de una entrevista, para indagar las metodologías utilizadas en la tipificación de aislamientos con posible resistencia antimicrobiana.

Los resultados obtenidos demostraron la producción de la β -lactamasas de tipo KPC detectada fenotípicamente en los 19 aislamientos y desde el punto de vista genotípico los resultados obtenidos de los aislamientos productores de KPC-2 no correspondieron a un único tipo clonal, el secuenciotipo 258 (ST258) además de detectarse nuevos secuenciotipos más virulentos como el ST25 y ST11 y clones de alto riesgo como el ST307. Se identificó el transposón 4401 (Tn4401) como el elemento genético involucrado en la diseminación horizontal de *bla*_{KPC-2}. Se observó que en los centros de salud o investigación de El Salvador no pueden realizarse todas las técnicas debido a la falta de recursos.

En ese sentido se concluye la importancia de realizar y poder mejorar la epidemiología regional y los procesos de verificación de resistencia bacteriana para diversos patógenos.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCIÓN

El problema de la multiresistencia antimicrobiana se ha convertido en un fenómeno a nivel mundial y constituye uno de los temas prioritarios para la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual ha solicitado elaborar planes de acción que refuercen los sistemas de salud y de vigilancia, de modo que puedan prevenir y gestionar la resistencia antimicrobiana. *Klebsiella pneumoniae* productora de la carbapenemasa de tipo KPC ha sido reportada a nivel mundial y el tratamiento de las infecciones provocadas por dicho patógeno se ha establecido como un problema global.

Según la Red Latinoamericana de Vigilancia de las Resistencias a los Antimicrobianos (RELAVRA), en su “Informe anual de la red de monitoreo/vigilancia de la resistencia a los antibióticos y de infecciones asociadas a la atención de la salud – 2014” reportó para El Salvador en 2013, un 0.4% de resistencia a imipenem (IPM) y un 0.5% de resistencia a meropenem (MEM) en aislamientos de microorganismos hospitalarios. Para el mismo año, en Argentina se reportaba un 9.0% de resistencia a IPM y un 8.0% de resistencia a MEM en aislamientos de microorganismos hospitalarios.

Razón por la cual desde el año 2017 *Klebsiella pneumoniae* se encuentra entre los patógenos críticos definidos por la OMS que marco una pauta para iniciar una investigación más profunda sobre el tema de resistencia antimicrobiana, y específicamente la resistencia a los carbapenemes producida por enzimas del tipo KPC, puesto que los carbapenemes son antibióticos que constituyen uno de los tratamientos de último recurso en pacientes hospitalizados con infecciones por microorganismos multirresistentes.

Se tipificaron 19 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* recuperados de infecciones nosocomiales o de cultivos de vigilancia en el Hospital Alemán de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina durante el periodo de noviembre de 2016 a febrero de 2017. Los porcentajes de prevalencia de KPC en *Klebsiella pneumoniae* para los 3 últimos años previos a la investigación en el Hospital Alemán fueron los siguientes: 18.3% (2016); 37.0% (2017); 25.0% (2018) en aislamientos de pacientes hospitalarios. (Datos proporcionados por CONICET, septiembre 2018)

El presente trabajo de investigación se realizó en dos fases, la primera fase comprendió la tipificación de los 19 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* antes mencionados, donde se utilizaron técnicas de tipificación fenotípicas como antibiograma, determinación de la sensibilidad por sistema automatizado y prueba de confirmación de doble disco; además de técnicas con enfoque genotípico para detectar β -lactamasas de tipo KPC mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la utilización de enzimas de restricción del genoma (XbaI) seguido por electroforesis de campo pulsado (PFGE) y el estudio de tipificación multilocus de secuencias (Multilocus sequence typing, MLST) para determinar el secuencia tipo, y por último la caracterización del entorno genético de *bla_{KPC-2}* y la tipificación de los plásmidos portadores de *bla_{KPC}*

La segunda fase de la investigación se basó en el diagnóstico en los centros de investigación y salud encargados de realizar el monitoreo de la resistencia bacteriana en El Salvador, mediante una entrevista a los jefes de departamentos de dichos centros. Los resultados de este estudio se dieron a conocer a los centros y laboratorios de investigación y vigilancia epidemiológica de El Salvador con el objetivo de proponer dichas técnicas para futuras investigaciones en las que se evalúe la resistencia antimicrobiana de patógenos frecuentes en El Salvador.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Tipificar con enfoques fenotípicos y genotípicos aislamientos hospitalarios de *Klebsiella pneumoniae* productores de la carbapenemasa KPC-2.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Identificar fenotípicamente la presencia de β -lactamasas de tipo KPC mediante ensayos de difusión en medio sólido.
- 2.2.2 Detectar los genes codificantes de KPC (*bla_{KPC}*) en los aislamientos en estudio mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 2.2.3 Establecer posibles relaciones de clonalidad entre los microorganismos productores de KPC, mediante la utilización de enzimas de restricción del genoma en conjunto con electroforesis de campo pulsado (PFGE) y por medio de tipificación multilocus de secuencias (MLST).
- 2.2.4 Determinar los elementos genéticos involucrados en la diseminación horizontal de resistencia, a través del estudio de la asociación a elementos genéticos móviles como transposones y la tipificación de los plásmidos portadores de *bla_{KPC-2}*
- 2.2.5 Realizar una entrevista en las unidades relacionadas con la verificación de la resistencia bacteriana en centros de salud o investigación en el departamento de San Salvador.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TÉORICO

3.1 Enterobacteriaceae

La familia Enterobacteriaceae son bacilos gram negativos de 0.3 a 1 μm ancho y de 1-6 μm de largo, de bordes redondeados, no formadores de endoesporas, pueden ser móviles (gracias a sus flagelos peritricos) o inmóviles, encapsulados o no, catalasa positivos y oxidasa negativos. Tienen poca exigencia nutricional lo cual permite que sean fáciles de cultivar en medios comunes de siembra primaria, crecen en una temperatura optima entre 25°C y 37°C. Son anaerobios facultativos. Su metabolismo es respiratorio y fermentativo. Muchos de ellos pueden encontrarse en el intestino de los humanos y animales. (2, 27, 28)

Esta familia comprende un amplio grupo de microorganismos que son potencialmente patógenos, entre ellos: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*.

Las infecciones que pueden ser causadas por enterobacterias se localizan principalmente en el tracto gastrointestinal y urinario. Las infecciones extraintestinales en algunos casos ocurren en pacientes con algún tipo de compromiso del sistema inmune convirtiéndose en patógenos oportunistas. (28,30)

3.2 *Klebsiella pneumoniae*

El género fue llamado así en honor a Edwin Klebs, un microbiólogo alemán de finales del siglo XIX. Dentro del género *Klebsiella* las especies relacionadas con infecciones humanas son cinco: *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *K. ornithinolytica*, *K. pneumoniae* y *K. rhinoscleromatis*. Las especies de *Klebsiella* producen infecciones urinarias y extraintestinales, también pueden producir cuadros

septicémicos, respiratorios e infecciones de heridas, siendo las más comunes *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*.

K. pneumoniae se ubica dentro de los diez principales microorganismos asociados a infecciones nosocomiales. Se define como un patógeno oportunista ya que causa infecciones graves en pacientes comprometidos. ⁽⁴⁹⁾

Su asociación frecuente como causa de infecciones al cuidado de la salud y la comunidad se debe a la presencia de los siguientes factores de virulencia:

- Cápsula, que le permite evadir el sistema inmune.
- Estructuras especializadas, que le permiten adherirse a las células del hospedero (pilis).
- Sideróforos, que le permiten obtener el hierro necesario para su desarrollo.

Además, las cepas silvestres de esta especie poseen una resistencia natural a las aminopenicilinas debido a la presencia de una β -lactamasa cromosómica (SHV-1)^(27, 34, 59)

La resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antimicrobianos ha evolucionado de acuerdo con la aparición y uso de estas moléculas, siendo cada vez más amplio el espectro que abarcan, pasando por la producción de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), que degradan las cefalosporinas de últimas generaciones y el aztreonam hasta las enzimas del tipo KPC, que degradan a los carbapenemes (imipenem, meropenem y ertapenem).^(38, 68)

Estos antibióticos pueden ser ineficaces para tratar enterobacterias en infecciones con bacterias productoras de KPC que son, además, resistentes a muchas otras moléculas que no son β -lactámicos, dejando pocas opciones terapéuticas disponibles. ⁽⁴⁸⁾

3.3 Antibióticos

El término antibiótico se refiere al subgrupo de antimicrobianos con actividad antibacteriana. Los antibióticos conforman un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico.

- a) Bactericidas: su acción es letal. Algunos de ellos producen la lisis bacteriana.
- b) Bacteriostáticos: a las concentraciones que alcanzan en el suero o tejidos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, pero sin llegar a destruir las células.

Con base a sus mecanismos de acción se dividen en: inhibidores de la formación de la pared bacteriana (como los β -lactámicos), inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la duplicación del ADN, inhibidores de la membrana citoplasmática, inhibidores de vías metabólicas (Ver figura N°1). (21, 56)

3.4 Antibióticos β -lactámicos

Los β -lactámicos son un grupo de antibióticos de origen natural semisintético o sintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo β -lactámico como se puede observar en la figura N°2.

Existen diferentes grupos dentro de esta familia: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactames e inhibidores de las β -lactamasas. (Ver tabla N°1). (40, 56, 61)

Actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica.

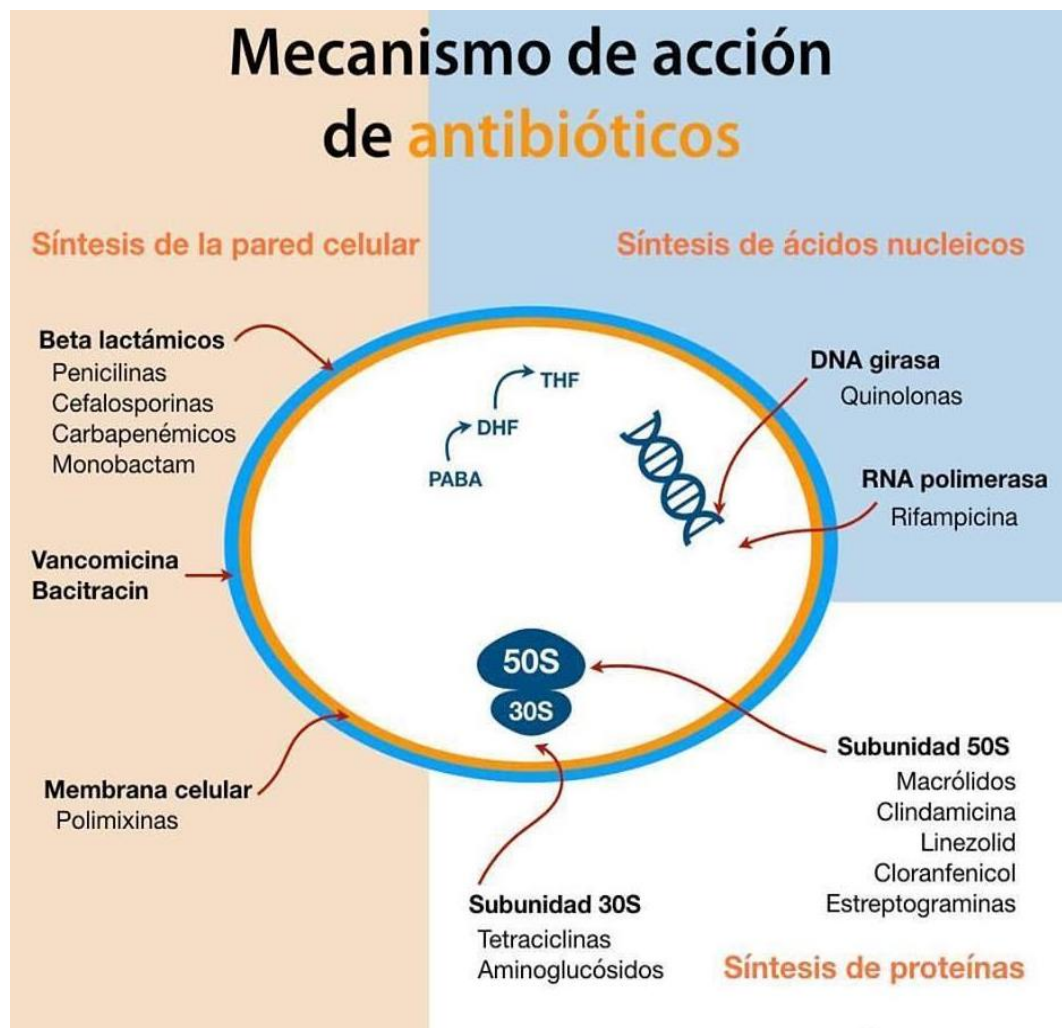


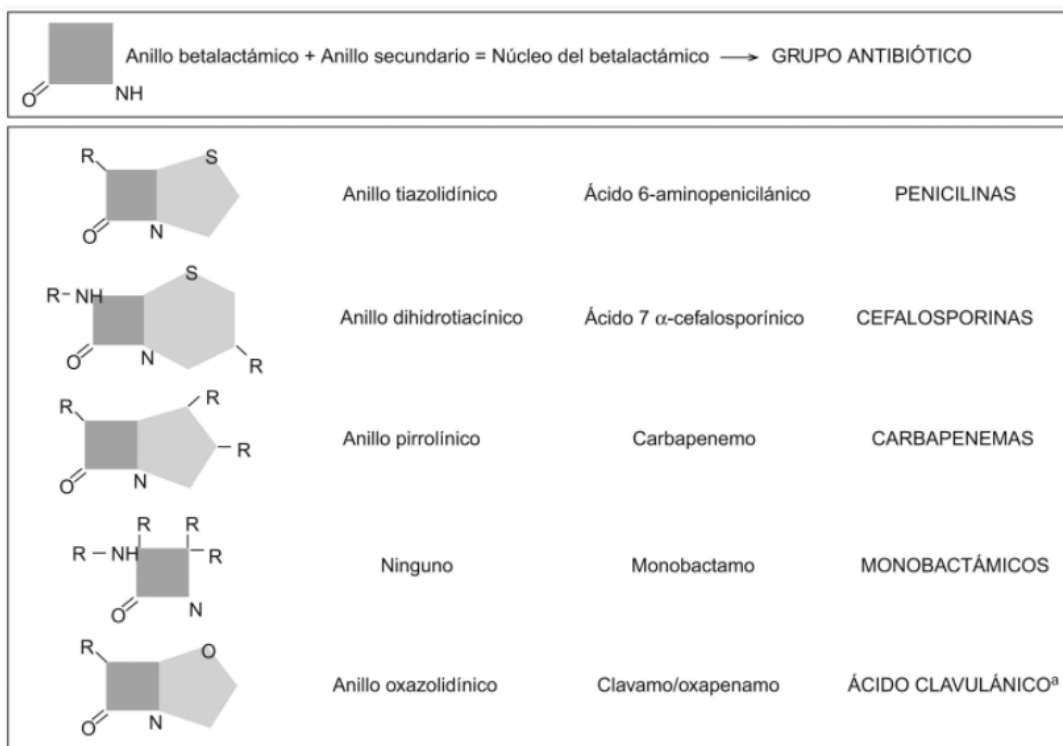
Figura N° 1 Sitios de acción de los antibióticos. (21)

Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. (40, 61)

Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos gram negativos; sin embargo, la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones. (56)

Tabla N° 1 Resumen de antibióticos β -Lactámicos. Autoría propia.

Antibiótico	Definición e integrantes
Penicilinas	<p>Son un grupo de antibióticos de origen natural y semisintético que contienen el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, que consiste en un anillo β-lactámico unido a un anillo tiazolidínico.</p> <p>Dentro de las origen natural se encuentran:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Bencilpenicilina o penicilina G -Bencilpenicilina procaína o penicilina G procaína -Bencilpenicilina benzatínica o penicilina G benzatínica -Fenoximetilpenicilina o penicilina V <p>Y en las semisintéticas se encuentran:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Resistentes a penicilinasas: cloxacilina, oxacilina, meticilina -Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina -Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina -Ureidopenicilinas: piperacilina, mezlocilina
Cefalosporinas	<p>Son productos de origen natural derivados de productos de la fermentación del <i>Cephalosporium acremonium</i>. Contienen un núcleo constituido por ácido 7-aminocefalosporánico formado por un anillo β-lactámico unido a un anillo de dihidrotiazino.</p> <p>Se definen cuatro generaciones de cefalosporinas como, por ejemplo:</p> <ul style="list-style-type: none"> -1ª generación: cefazolina, cefalotina -2ª generación: cefuroxima, cefoxitina, cefotetán, cefaclor, cefamandol -3ª generación: cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima -4ª generación: cefepima, cefpiroma
Monobactámicos	<p>Es un β-lactámico sintético, posee una excelente actividad sobre bacterias gram negativas aerobias y facultativas. Por el contrario, carece de actividad frente a grampositivos y bacterias anaerobias</p> <p>Es el único monobactámico disponible para uso clínico: Aztreonam</p>
Carbapenemes	<p>Son una clase única de β-lactámicos que presentan el mayor espectro de actividad conocido dentro de este grupo de antibióticos y se consideran la opción terapéutica frente a enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Siendo la última opción terapéutica frente a bacterias resistentes según la OMS.</p> <p>Primer carbapeneme: Imipenem</p> <p>Carbapenemes modernos: Meropenem y Ertapenem.</p>



^aTodos los inhibidores de las betalactamasas que se usan en la práctica (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) tienen estructura betalactámica. El sulbactam y el tazobactam son derivados sulfónicos del ácido penicilánico

Figura N° 2 Estructura general de los β -Lactámicos.⁽⁶¹⁾

3.5 Mecanismos de acción de los antibióticos β -lactámicos

Los β -lactámicos tienen una acción bactericida llevada a cabo principalmente por dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana.

La pared bacteriana es una estructura que envuelve a las bacterias de todos los géneros, exceptuando a los micoplasmas; se sitúa por fuera de la membrana citoplásmica y está compuesta principalmente por peptidoglicano. (Ver figura N°3)

La destrucción de la pared bacteriana se produce como consecuencia de la inhibición de la última etapa de la síntesis del peptidoglicano, el cual está constituido por largas cadenas de glúcidos, formadas por la repetición de moléculas de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina.

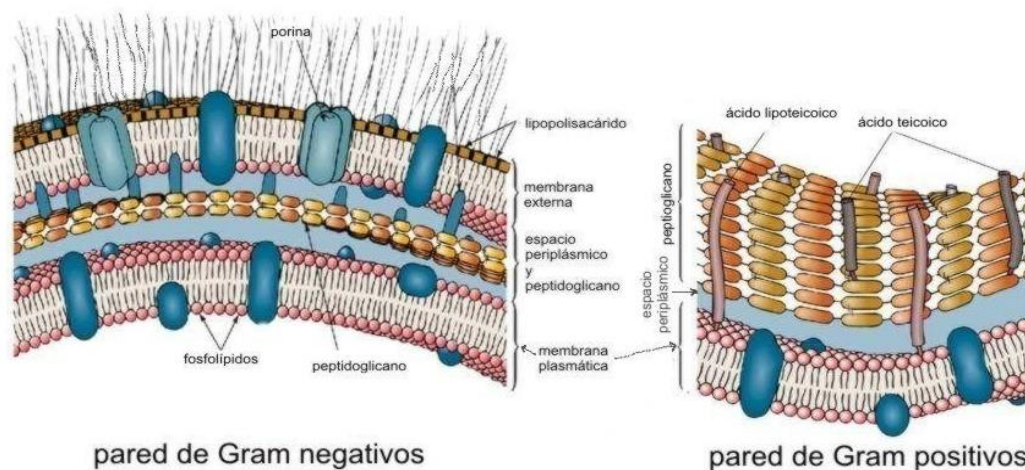


Figura N° 3 Envolturas de bacterias gram negativo y gram positivo. (19)

A su vez, el ácido murámico fija cadenas de tetrapéptidos que se unen entre sí y forman una malla. Los diferentes componentes del peptidoglicano se sintetizan en el citoplasma y son transportados a través de la membrana citoplásmica al espacio que hay entre ésta y la pared celular (espacio periplásmico), donde se van ensamblando hasta formar la estructura, como se observa en la figura N°4

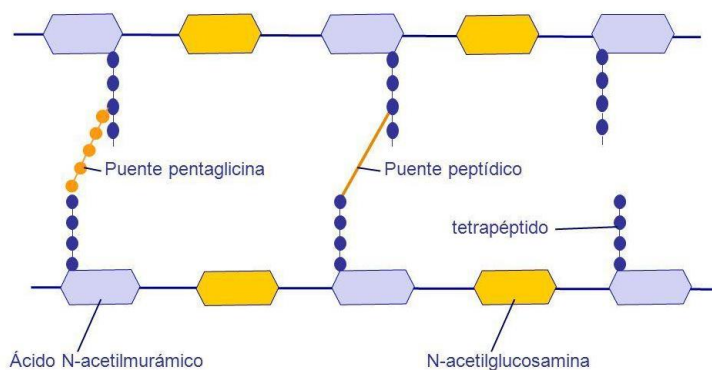


Figura N° 4 Estructura de peptidoglicano, Autoría propia

La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos (mediante la pérdida de uno de los aminoácidos terminales), para lo que se necesita la acción de unas proteínas con actividad enzimática (transpeptidasas y carboxipeptidasas) enzimas que se localizan en ese espacio periplásmico, a este nivel son las encargadas de formar los tetrapéptidos unidos.

Estas enzimas fijan a las penicilinas y otros β -lactámicos, por lo que se llaman PBP (*penicillin binding protein* "proteína ligada a la penicilina") cuya función es alargar, dar forma y dividir la bacteria.

El anillo β -lactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido, en los dos últimos aminoácidos es decir en la terminación D-alanina D-alanina, lo cual permite una unión covalente en el lugar activo de la transpeptidasa e impide la formación de la pared celular. También pueden inhibir a las carboxipeptidasas y algunas endopeptidasas (Ver figura N°5)

Sin la pared, la bacteria queda expuesta al medio y muere debido a cambios en la presión osmótica. Por tanto, para que actúen los β -lactámicos, es preciso que la bacteria se halle en fase de multiplicación, ya que éste es el momento en que se sintetiza la pared celular. Los β -lactámicos presentan actividad reducida en situaciones clínicas en las que hay gran parte de la población bacteriana en estado estacionario, un claro ejemplo son los abscesos.

Los β -lactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglucano. Las cepas que carecen de autolisina (generalmente son cepas tolerantes a los β -lactámicos) inhiben su crecimiento en presencia del β -lactámico, pero no se destruyen completamente.

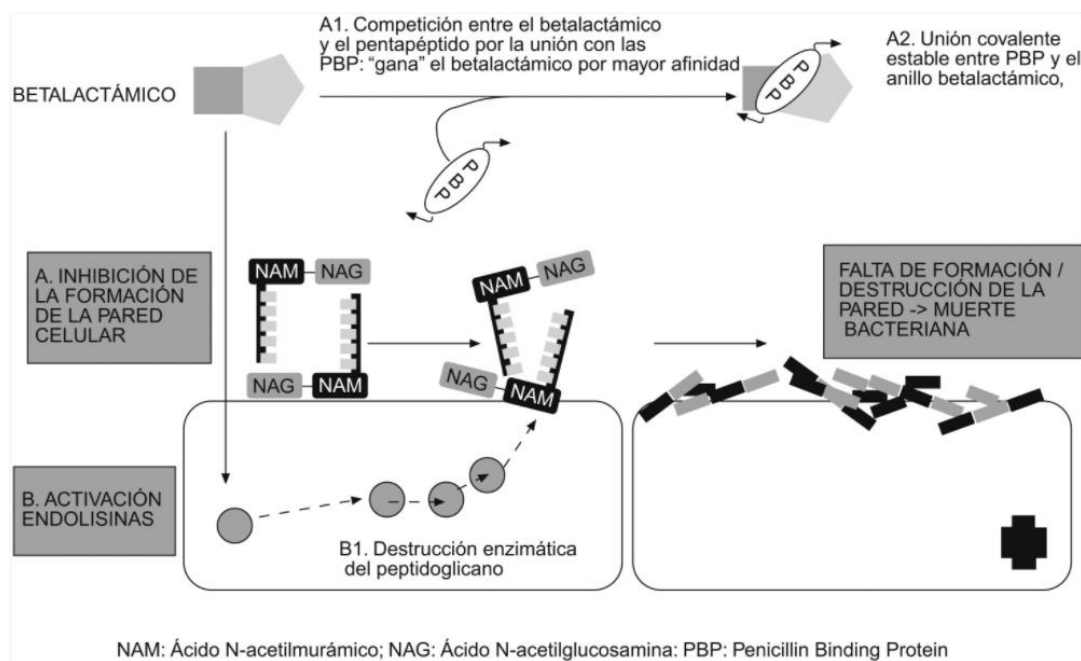


Figura N° 5 Mecanismo de acción de los betalactámicos.⁽⁶¹⁾

3.6 Mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos

Las bacterias pueden desarrollar resistencia a los β -lactámicos por varios mecanismos, que en ocasiones pueden estar asociados.

La localización genética de estos mecanismos puede ser cromosómica, plasmídica y a su vez puede estar asociada a transposones e integrones. Los mecanismos implicados son los siguientes:

3.6.1 Alteraciones de la permeabilidad

Debido a la presencia de membrana externa en los bacilos gramnegativos se dificulta la penetración de sustancias hidrofílicas, como los β -lactámicos, que necesitan utilizar los poros proteicos (porinas) para ese caso. La resistencia es secundaria a alteraciones en dichas porinas.

Dichas alteraciones no generan franca resistencia, pero en conjunto con otros mecanismos se da un efecto sinérgico que potencia la resistencia de la bacteria a diferentes antibióticos. ⁽⁴⁰⁾ (Ver figura N°6)

3.6.2 Modificación de las dianas

Los β -lactámicos deben unirse a las PBP para ejercer su efecto bactericida. Por lo que, al existir cambios a nivel de las PBP, implica una pérdida de afinidad de los β -lactámicos por ellas, lo que lleva a una disminución de su actividad ⁽⁴⁰⁾. (Ver figura N°6)

3.6.3 Expresión de bombas de eliminación activa

Los mecanismos de expulsión consisten en bombas de eflujo, dependientes de energía, que bombean el antimicrobiano que ya se encuentra en el citoplasma bacteriano hacia el exterior. Este mecanismo es muy frecuente en bacilos gramnegativos no fermentadores, especialmente en *P. aeruginosa*. (Ver figura N°6)

3.6.4 Producción de enzimas (β -Lactamasas)

Todos los mecanismos de resistencia ya sean naturales o adquiridos, son importantes, pero en cuanto a eficiencia, la producción de enzimas constituye el principal mecanismo de resistencia a los β -lactámicos en las bacterias gram negativas.

Las β -lactamasas son enzimas catalíticas de naturaleza proteica cuya producción está controlada por un gen cuya localización puede ser cromosómico o plasmídico.

Las β -lactamasas actúan rompiendo el enlace amida del anillo β -lactámico, previa unión al grupo carboxilo, con lo que este pierde la capacidad de unirse a las PBP. El grado de resistencia que determinan se correlaciona con su concentración, afinidad por los diferentes β -lactámicos y propiedades hidrolíticas.

La producción de β -lactamasas puede ser constitutiva (se producen siempre) o inducible (sólo en presencia de un β -lactámico inductor). Dependiendo de la β -lactamasa, no todos los β -lactámicos tienen el mismo poder de inducción, pudiendo ser desde poco a altamente inductores.

Ambos tipos de expresión (constitutivo e inducible) pueden encontrarse tanto en β -lactamasas de codificación cromosómica como de codificación plasmídica, aunque por lo general las β -lactamasas plasmídicas son de expresión constitutiva y su grado de expresión puede estar determinado por el número de copias del plásmido ⁽¹⁾ (Ver figura N°6)

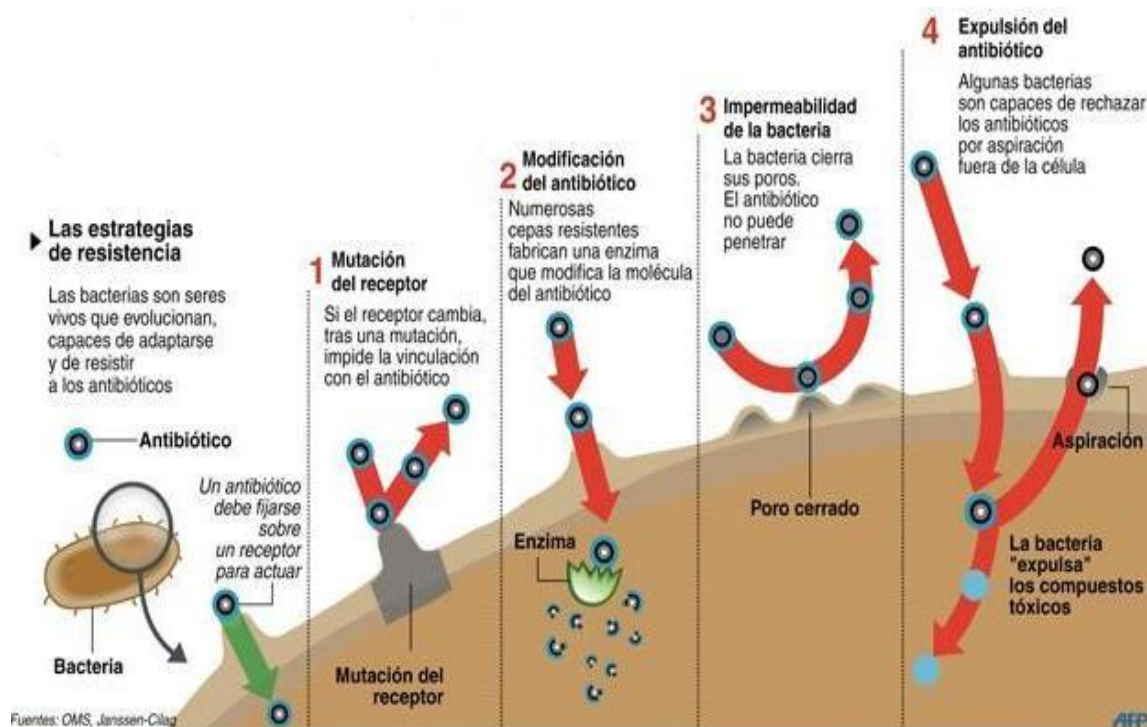


Figura N° 6 Mecanismos de resistencia a los antibióticos. (29)

3.7 β -lactamasas

En los microorganismos gram negativos las β -lactamasas se encuentran en la región periplásmica y su función es hidrolizar el antibiótico β -lactámicos, rompiendo el enlace amida del anillo del mismo e impidiendo que este ejerza su efecto bactericida.

Como ya se mencionó, los genes codificantes de β -lactamasas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano y también en elementos extra cromosomales, conocidos también con el nombre de Plásmidos.

Éstos últimos están compuestos por ADN circular, siendo totalmente independientes del cromosoma y con capacidad de movilizarse fácilmente entre una bacteria a otra, tanto en especies de un mismo género o entre géneros diferentes. (Ver figura N°7)

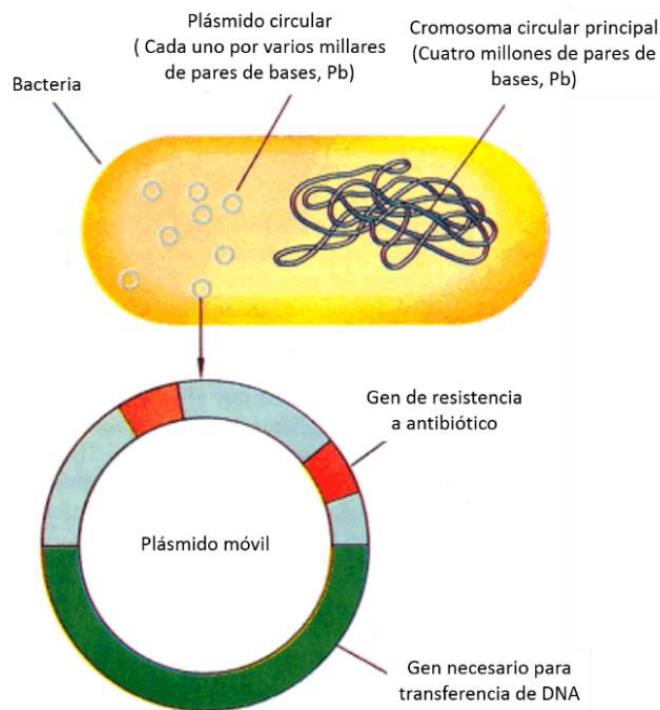


Figura N° 7 Plásmido bacteriano. (6)

Las β -lactamasas se pueden clasificar de acuerdo a su secuencia de aminoácidos y la presencia de motivos conservados (clasificación de Ambler), y también mediante un esquema funcional (clasificación de Bush).

La clasificación de Ambler se propuso por primera vez en 1980 y establece cuatro clases moleculares: A, B, C y D. Las β -lactamasas de clase A, C y D son serinoenzimas y las de clase B son metalo- β -lactamasas. En las serino- β -lactamasas una serina del sitio activo de la enzima está principalmente involucrada en la hidrólisis del antibiótico, mientras que las enzimas de clase B se caracterizan por presentar 2 átomos de Zinc en su sitio activo (Ver figura N°8) ⁽¹⁾

Por otra parte, el esquema propuesto por Bush por primera vez en 1989, finalmente actualizado en 2010, contempla el perfil de sustratos e inhibidores de las β -lactamasas, así como el peso molecular y el punto isoeléctrico de las mismas. Esta clasificación pretende agrupar a estas enzimas de manera que se pueda asociar su presencia con un fenotipo de resistencia determinado en aislamientos bacterianos ⁽¹¹⁾.

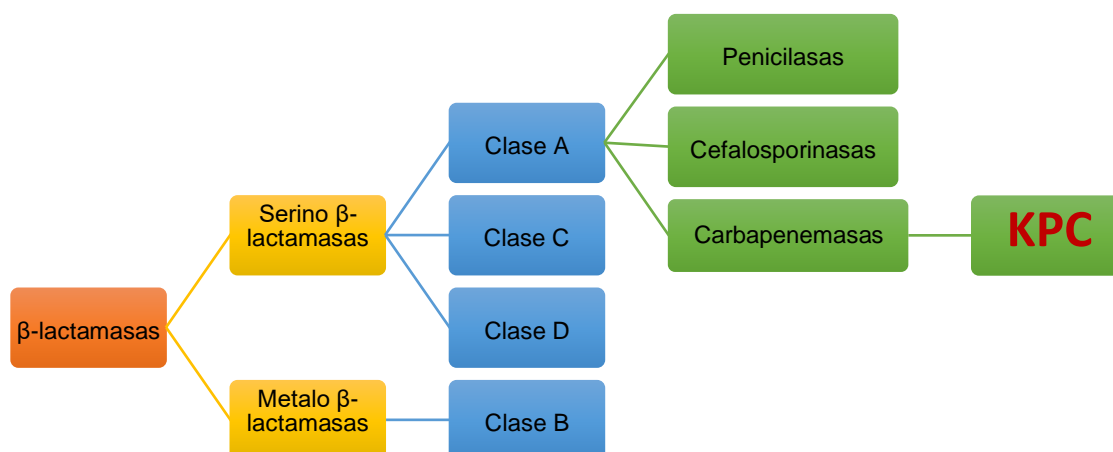


Figura N° 8 Clasificación de Ambler para β -lactamasas combinada con nomenclatura coloquial de acuerdo al espectro de acción. Elaboración propia.

3.8 β -lactamasas en *Klebsiella pneumoniae*

El uso extensivo de β -lactámicos, produjo un ambiente idóneo para la selección de bacilos gram negativos productores de β -lactamasas. Desde la década del 60's el uso de aminopenicilinas permitió seleccionar aquellos microorganismos productores de β -lactamasas de espectro ampliado (BLEA), que fueron capaces de hidrolizar estos antibióticos.

TEM-1 es la BLEA más diseminada en *E. coli*. (TEM en referencia a Temoniera nombre de la paciente en cuyo hemocultivo se aisló por primera vez en una cepa *E. coli* productora de esta enzima) ^(15, 38).

La diseminación y propagación de los genes codificantes de BLEA en enterobacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae* de origen hospitalario, se vio favorecida a la localización plasmídica de dichos genes. La aparición y uso de las cefalosporinas de tercera generación permitió el tratamiento de infecciones provocadas por microorganismos productores de BLEA. Sin embargo, a principios de la década de los años 80 se reportó por primera vez en Alemania la resistencia transferible de *K. pneumoniae* a cefalosporinas de tercera generación.⁽³⁸⁾

Además, en el año de 1985 se describió en el mismo país la mutación de la SHV-1 ("sulphydril variable" que describe las propiedades bioquímicas de la enzima) produciendo una nueva enzima (SHV-2), causante de la resistencia de *Klebsiella ozaenae* a las cefalosporinas de amplio espectro, y de allí su denominación como β -Lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) dando un amplio perfil de hidrólisis desde las aminopenicilinas pasando por cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación (con excepción de las cefamixinas: cefoxitin y cefotetan) hasta monobactams. Los inhibidores de β -lactamasas (sulbactam, tazobactam y el

ácido clavulánico) bloquean su actividad, se vuelven de interés dentro de los tratamientos de infecciones producidas por microorganismos productores de β -lactamasas de clase clase A de tipo BLEA y BLEE.⁽¹⁾

El problema ha alcanzado tal dimensión que estudios epidemiológicos de resistencia han reportado porcentajes de *K. pneumoniae* productoras de BLEE que pueden llegar hasta el 60%, dependiendo del país y del hospital estudiado.⁽³⁸⁾

En El Salvador se encuentran en proceso los estudios epidemiológicos que arrojarán la información sobre este tema, y se espera conocer la información a finales del año 2019 siendo el Laboratorio de Referencia Nacional “Max Bloch” el encargado de emitir el informe correspondiente (Según datos de entrevista proporcionados por la encargada de la Sección de Bacteriología, mayo 2018.)

Las consecuencias de las infecciones por bacterias resistentes, como las mencionadas productoras de BLEA y BLEE, afectan directamente al sistema de salud. Esto se debe a un incremento de la estancia hospitalaria, la mortalidad y de los costos de la atención médica. La situación se ve complejizada ya que en muchas ocasiones las cepas productoras de BLEE son además resistentes a otras familias de antibióticos.

En este panorama, el tratamiento de las infecciones bacterianas debió dirigirse al uso de los β -lactámicos del grupo de los carbapenemes. El imipenem, primer carbapeneme empleado en la clínica, estuvo disponible a partir de 1985, y en 1996 surgió el meropenem. El ertapenem se utiliza desde 2003 y doripenem se introdujo al mercado en 2005. ^(15,38).

Sin embargo, debido al uso extendido de estos antibióticos se han seleccionado bacilos gram negativos productores de carbapenemasas y desde hace más de

una década la presencia de los mismos es reportada cada vez con más frecuencia en todas partes del mundo.

3.9 β -lactamasas de clase A, Carbapenemasas tipo KPC

Las enzimas de tipo KPC llamadas así por *K. pneumoniae* carbapenemasa, son serino enzimas de ubicación plasmídica, inhibibles por el ácido clavulánico. Se describieron por primera vez en un aislamiento de *K. pneumoniae* en Estados Unidos en 2001, en Carolina del Norte. (24, 70).

Hasta 2005, la distribución de estas enzimas generalmente se reportaba en miembros de la familia Enterobacteriaceae incluyendo *Enterobacter spp.*, *E. coli*, y *Serratia marcescens* y particularmente en *K. pneumoniae*.

Puesto que para esa época la detección era generalmente limitada a la parte Este de Los Estados Unidos por lo que encontrar aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC fuera de los EE. UU era infrecuente. (43, 48)

Tiempo después los aislamientos productores de KPC se describieron en diferentes ubicaciones de EE. UU. y en todo el mundo (Ver figura N°9) razón por la cual se considera que son las carbapenemasas más ampliamente diseminadas a nivel mundial.

El espectro de hidrólisis de las enzimas de tipo KPC comprende todos los β -lactámicos, incluyendo a las penicilinas, cefalosporinas, monobactames e incluso carbapenemes, restringiendo de esta forma las opciones terapéuticas de las infecciones por producidas por los microorganismos productores. (15, 48)

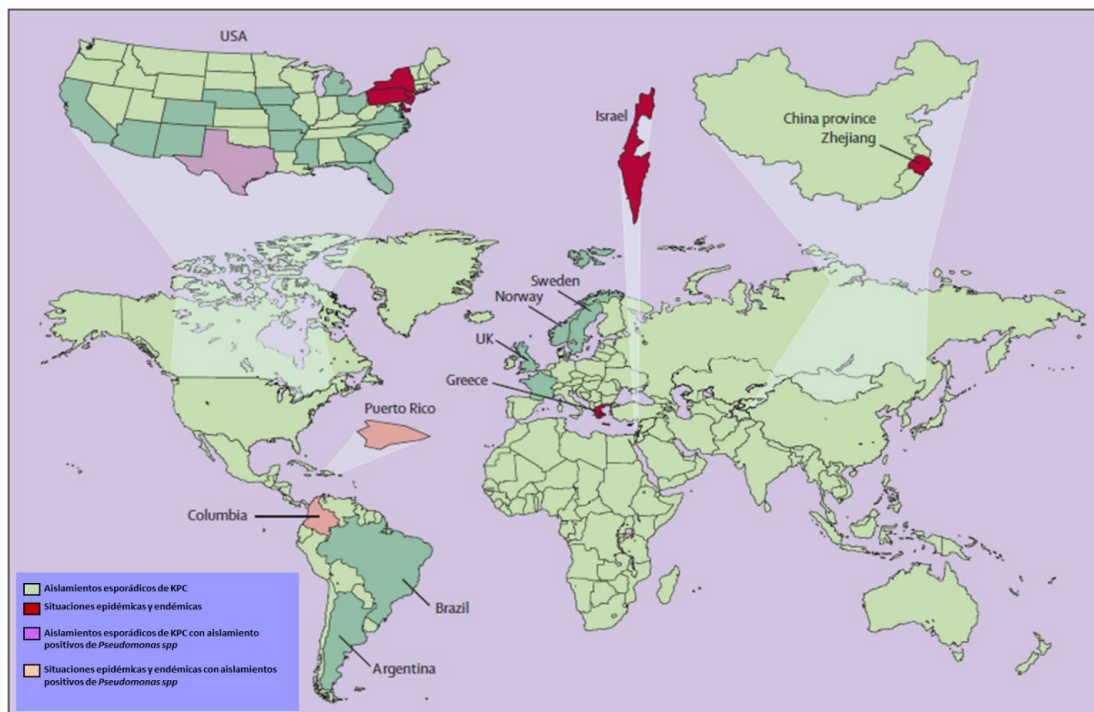


Figura N° 9 Distribución geográfica del KPC en todo el mundo. (48)

En Argentina estas enzimas fueron detectadas por primera vez en 2006 en *K. pneumoniae* y, en concordancia con la situación mundial, a partir de 2010 el incremento de este tipo de enzimas en aislamientos de esta especie fue alarmante. Esto se debió a la gran diseminación epidémica de un clon altamente exitoso a nivel global el ST258, el cual finalmente se estableció como endémico en Argentina. (16)

Además, el clon ST258, está compuesto por dos linajes genéticos, denominados clado I y clado II. El clado I está asociado con KPC-2 y el clado II con KPC-3. La divergencia genética entre estos dos clados radica en una región de 215 Kb que incluye genes involucrados en la síntesis de la cápsula de polisacárido (*cps*). Esta región de divergencia sería un *hot spot* para eventos de recombinación y, según DeLeo y cols., contribuiría en la exitosa diseminación del clon ST258. (66)

Existen 20 variantes de KPC información que puede ser consultada directamente desde el sitio web de National Center for Biotechnology Information (NCBI) por sus siglas en inglés, y que se encuentra siendo actualizada constantemente. ⁽⁴⁵⁾

KPC-2, inicialmente de *Klebsiella* spp. es la enzima de tipo KPC más comúnmente detectada en *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas* spp. Se conoce que son codificadas por genes (bla_{kpc}) de ubicación plasmídica. El gen bla_{kpc-2} está asociado con el transposón Tn4401, que es un elemento móvil (ver figura N°10).

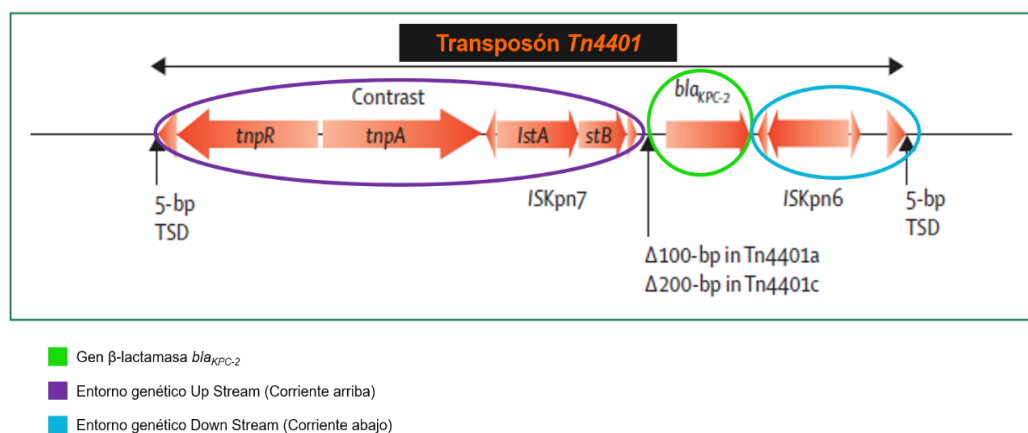


Figura N° 10 Representación esquemática de estructuras Tn4401 identificadas en plásmidos de origen natural. ⁽⁴⁸⁾

Este transposón tiene un tamaño de 10 kb, está flanqueado por una duplicación del sitio de destino de 5 bp, la firma de un evento de transposición reciente, y se inserta en diferentes marcos de lectura abiertos, ubicados en plásmidos que varían en tamaño y naturaleza, además del gen β-lactamasa bla_{kpc-2} , se encuentra un gen transposasa, un gen resolvasa, y dos nuevas secuencias de inserción, $ISKpn6$ e $ISKpn7$.

Tn4401 se consideró el origen de la adquisición de bla_{KPC} y disseminación a plásmidos de varios tamaños identificados en aislamientos no relacionados a *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* aislados de los Estados Unidos, Colombia y Grecia.

Aunque el entorno genético de *bla*_{KPC} de aislamientos recuperados en China es diferente, son todavía asociados con un elemento transponible.^(43, 48)

En El Salvador no se encuentra un registro consistente de detección de estas enzimas, sin embargo, actualmente se trabaja en esfuerzos para poder tener información detallada sobre estas enzimas, razón por la cual es importante poder aplicar estas técnicas de estudio e identificación en las cepas aisladas de centros hospitalarios con perfiles de resistencia a las carbapenemes.

3.10 Métodos aplicados al estudio de tipificación con enfoques fenotípicos y genotípicos de *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC

3.10.1 Métodos Fenotípicos

Sensibilidad antimicrobiana por método automatizado

La tecnología automatizada y semiautomatizada en microbiología ha experimentado grandes avances en los últimos años. La identificación de bacterias patógenas aisladas de procesos infecciosos y los resultados de susceptibilidad *in vitro* constituyen herramientas fundamentales para un manejo eficiente de estos microorganismos. Por tanto el empleo de métodos rápidos y automatizados en microbiología se hace cada vez más frecuente.⁽⁵⁸⁾

El uso de equipos automatizados requiere un tiempo reducido para la obtención de los resultados en comparación con los métodos “convencionales”, son fáciles de usar, precisos y en muchos casos económicamente rentables teniendo en cuenta la relación costo/beneficio.

La rapidez en el diagnóstico y el tratamiento reduce la morbi-mortalidad así como la propagación de la infección lo que se traduce en beneficios para el paciente,

cuando se trata de muestras de origen clínico. Uno de los equipos más utilizados es el VITEK, el cual posee un sistema automatizado de identificación bacteriana y estudio de sensibilidad antimicrobiana. ⁽³⁷⁾

La identificación de las bacterias se basa en la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas.

La sensibilidad antimicrobiana se lleva a cabo en forma similar a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos correspondientes a los puntos de corte de sensibilidad establecidos por el NCCLS. Este sistema se ha empleado para el estudio de cepas clínicamente significativas aisladas de muestras clínicas u otras fuentes como alimentos y agua.

Ensayos de difusión en medio sólido.

Uno de los métodos de difusión más utilizados es el antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos.⁽³¹⁾

3.10.2 Métodos Genotípicos

Métodos basados en PCR

PCR son las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa. La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas.⁽³⁵⁾

Utilización de enzimas de restricción (macrorrestricción) seguido de electroforesis de campo pulsado PFGE.

Esta técnica consiste en introducir el microorganismo en bloques o mejor conocidos como “plugs” de agarosa, este es lisado *in situ* y se digiere el ADN con enzimas de restricción. Los plugs de agarosa con el ADN bacteriano son insertados en un gel de agarosa, donde los fragmentos de restricción emigran por electroforesis de campo pulsado. Esto genera un patrón de bandas particular que puede ser comparado con otros aislamientos, y así poder agrupar a los microorganismos con pulsotipos similares. ⁽⁵⁾

Amplificación por PCR de 7 genes conservados y secuenciación MLST

La técnica más aplicada en epidemiología global así como con aislamientos de distintos períodos de tiempo. Se basa en la variación genética de siete genes conservados o “housekeeping genes” (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* y *tonB*).

Se asigna un número alélico diferente según la secuencia de cada locus, y luego el ST es determinado, conectando los siete números alélicos diferentes en un orden estandarizado.

Esta secuencia es ingresada en eBURST (<http://eburst.mlst.net/>), donde se identificará un genotipo a cada grupo, el esquema del procedimiento descrito puede verse en la figura N° 11.⁽⁵⁾

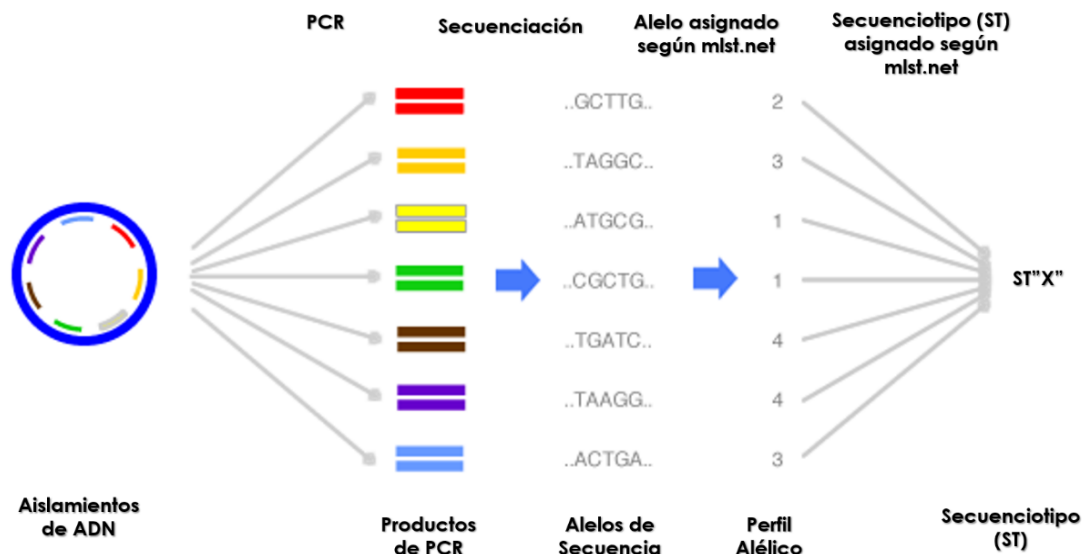


Figura N°11 Amplificación por PCR de 7 genes conservados y secuenciación MLST

Entorno Genético (Mapeo)

Este método permite conocer el entorno del gen de *bla_{KPC}* dentro del transposón, también se conoce como un “mapeo genético”, y la principal información que brinda es tener la ubicación del gen dentro del transposón, para poder asociar su facilidad de diseminación dentro de las familias de Enterobacteriaceae o incluso con familias fuera de esa clasificación, se realizó mediante reacciones de PCR Simple utilizando oligonucleótidos que permiten amplificar fragmentos conocidos, tomando como referencia la estructura básica del transposón Tn4401 presentada por la bibliografía consultada, como puede verse en la figura N°10, lo cual permitió diseñar reacciones dependiendo de los fragmentos que se deseaba amplificar para confirmar su presencia dentro del transposón, ya sea corriente arriba (Up stream) o corriente abajo (Down Stream) del gen de interés, para lo que se diseñaron 4 Reacciones de PCR Simples, 3 Reacciones Up Stream y 1 Reacción Down Stream.⁽⁶⁷⁾

Tipificación de plásmidos

Se conoce que la enzima KPC se encuentra codificada por el gen *bla_{KPC}*, localizado en el transposón Tn4401, que es derivado de Tn3, el que a su vez se encuentra portado, principalmente, en plásmidos aunque también ha sido informado en el cromosoma⁽⁶⁶⁾, algunos autores proponen que diferentes isoformas de Tn4401 parecen estar asociadas a diferentes plásmidos portadores de *bla_{KPC}* y las diferentes asociaciones pueden ser utilizadas como marcadores genéticos para distinguir los diferentes plásmidos.

Los plásmidos que poseen la misma capacidad de replicación son “incompatibles”, mientras que aquellos con diferente capacidad de replicación son “compatibles”. Por lo que dos plásmidos que provienen del mismo grupo de incompatibilidad no pueden coexistir en una misma célula de forma estable, puesto que no pueden ser propagados en la misma línea celular.

La identificación de los grupos de incompatibilidad es la forma más frecuente para clasificar plásmidos además esta herramienta permite seguir la evolución y diseminación de plásmidos emergentes.⁽⁵⁾ El gen *bla_{KPC}* es transportado por diferentes plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad (Inc). Estos incluyen IncFII, FIA, I2, A/C, N, X, R, P, U, W, L/M y ColE. Al contrario de otros genes portadores de carbapenemasa, *bla_{KPC}* se presenta principalmente en plásmidos en Enterobacteriaceae.⁽⁵⁾

La necesidad de rastrear plásmidos que confieren resistencia a antibióticos llevó al desarrollo de método de tipificación basado en PCR: inc/rep PCR. El mismo consta de 18 pares de primers, diseñados para realizar 5 multiplex y 3 simplex, los cuales reconocen los siguientes replicones: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I_x, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F y FIIA.⁽¹²⁾

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio:

- **Experimental:** contempla la Fase I, ya que se realizó la caracterización y tipificación de los aislamientos hospitalarios de *Klebsiella pneumoniae* recuperados de infecciones nosocomiales o de cultivos de vigilancia, haciendo uso de técnicas de biología molecular en el laboratorio de Microbiología y Resistencia Bacteriana de la Universidad de Buenos Aires, mediante enfoques fenotípicos y genotípicos que puedan ser aplicadas en los centros de investigación y salud en El Salvador.

4.2 Investigación Bibliográfica

Se realizaron consultas en libros y publicaciones de revistas científicas en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador (UES).
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM)

Bases de datos en línea:

- MEDLINE por la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos PubMed-NCBI.
- Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Organización Panamericana de la Salud (OPS).
- Internet

4.3 Investigación de campo

Contempla la fase II, en la que se realizó una entrevista (Ver anexo N°1) dirigida a los jefes de los departamentos de bacteriología, laboratorio clínico o los encargados de realizar el monitoreo de la resistencia bacteriana en los centros de salud en El Salvador para proporcionar un diagnóstico y brindar una visión general sobre el tema de resistencia actualmente en el país.

Universo: La red de laboratorios para la vigilancia de la resistencia antimicrobiana en El Salvador constituida por 24 Laboratorios de GOES, 8 Laboratorios del ISSS y 1 un Laboratorio de Sanidad Militar, haciendo un total de 29 hospitales y Unidades de Salud.

Muestra: dirigida puntual a los hospitales del área metropolitana, por ser los que atienden mayor número de pacientes que requieren una especialidad según su diagnóstico que otros hospitales nacionales.

Además se entrevistaron a los encargados o jefes de los departamentos de bacteriología, laboratorio clínico o los relacionados con el tema de la verificación de resistencia bacteriana de los siguientes centros:

- Hospital Nacional General "Dr. Juan José Fernández" Zacamil
- Hospital Nacional de La Mujer "Dra. María Isabel Rodríguez".
- Hospital General del Instituto del Seguro Social.
- Laboratorio de Referencia Nacional "Dr. Max Bloch"

4.4 Parte Experimental

Ver Listado de Equipos, materiales y preparación de reactivos y buffers en anexo N°2.

Universo: 24 aislamientos de *Kelbsiella pneumoniae* recuperadas de infecciones nosocomiales o de cultivos de vigilancia durante el periodo de noviembre de 2016 a febrero de 2017 en el Hospital Alemán de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

Muestra: 19 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* que presentan resistencia a imipenem (IMI) y meropenem (MER) con valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) de IMI ≥ 4 ug/mL y MER ≥ 4 ug/mL.⁽¹⁷⁾

Determinación de la sensibilidad. ^(25,63)

La determinación de la sensibilidad se realizó acorde a las tablas presentadas por el CLSI para los puntos de corte de los halos de inhibición y concentración mínima inhibitoria para enterobacterias, Tabla 2A-1⁽¹⁷⁾ y fue realizada por el Hospital Alemán de la ciudad de Buenos Aires mediante el Sistema de identificación microbiana completamente automatizado Vitek 2 Compact se refiere a la tecnología de colorimetría avanzada para identificación microbiana.

Procedimiento: Ver anexo N°3. ⁽⁴⁾

1. Transferir con asa estéril, a partir de un cultivo puro desarrollado durante 24 h en Agar nutritivo o TSA, una cantidad suficiente de inóculo a un tubo de ensayo de poliestireno claro de 12x75 mm que contiene 3 ml de solución salina estéril (Sol. Acuosa de NaCl 0.45% a 0.5%, pH 4.5 a 7.0).
2. Ajustar la turbiedad a 0.50-0.63 unidades de la escala de McFarland con el densitómetro.
3. Colocar el tubo de ensayo que contiene la suspensión bacteriana dentro de la gradilla especial (cassette), y la tarjeta de identificación de tipo GN-Bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores (Ver figura N°

- 12) se coloca en la ranura cercana, insertando el tubo de transferencia dentro del tubo con la suspensión correspondiente. Colocar el cassette con las muestras en el sistema VITEK 2.
- Una vez dentro del equipo, las muestras se someten a los siguientes procesos de forma automática: Inoculación Las muestras son transportadas a una cámara en la que se aplica vacío y en seguida se reintroduce nuevamente el aire, esta acción hace que la suspensión bacteriana pase a través del tubo de transferencia hacia los microcanales que llenan todos los pozos.
 - Sellado e incubación de las tarjetas. Las tarjetas inoculadas pasan por un mecanismo que corta los tubos de transferencia y las sella, previo a la carga dentro del carrusel-incubador. Todos los tipos de tarjetas se incuban en línea a $35.5 \pm 1.0^\circ \text{C}$. Lectura de las reacciones.

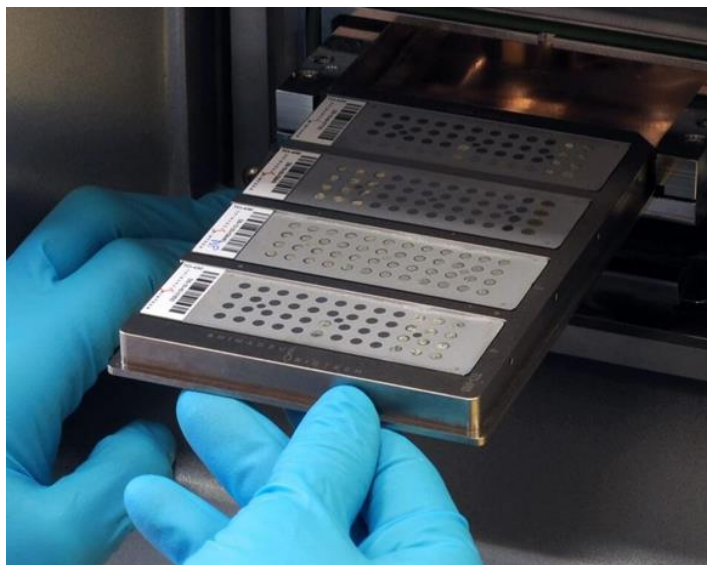


Figura N°12 Tarjeta de identificación para sistema vitek. (4)

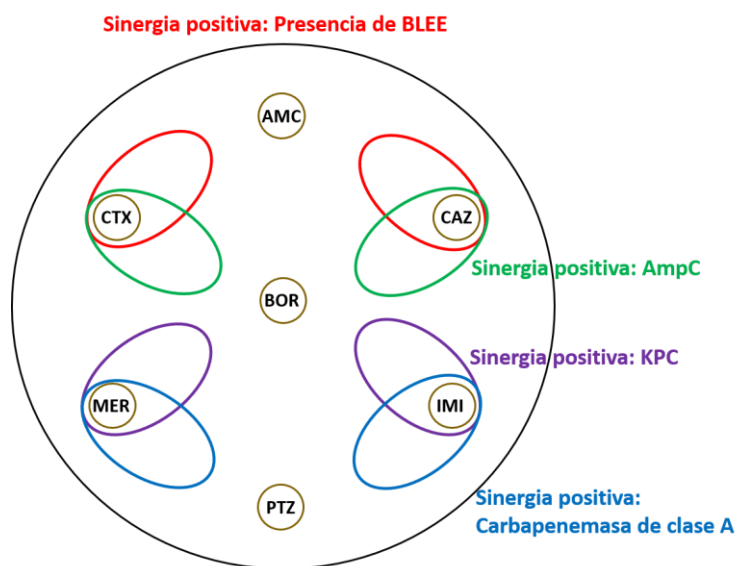
Este procedimiento se realizó en el Hospital Alemán de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina, el cual proporcionó los resultados para dar paso a las siguientes

determinaciones fenotípicas y genotípicas para el cumplimiento de los objetivos de este estudio.

4.4.1 Identificar fenotípicamente la presencia de β -lactamasas de tipo KPC mediante ensayos de difusión en medio sólido.

Uno de los métodos de difusión más utilizados es el antibiograma disco-placa es uno de los métodos recomendado por el NCCLS para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos.

Bajo ese fundamento se utiliza una disposición estratégica de los discos de antibióticos para la detección de enzimas de resistencia, entre ellas β -lactamasas de tipo KPC como puede verse en la figura N°13.



CTX: Cefotaxima, **AMC:** Amoxicilina/Ácido Clavulánico,
CAZ: Ceftazidima, **BOR:** Ácido fenil bóronico, **MER:** Meropenem,
IMI: Imipenem, **PTZ:** piperacilina-tazobactam

Fig. N° 13 Disposición estratégica de discos para la detección de enzimas de resistencia ⁽¹⁴⁾

Para detectar fenotípicamente la presencia de β -lactamasas de tipo KPC se realizó un ensayo de difusión de doble disco o de sinergismo con ácido fenil borónico (APB).^(39, 23)

Preparación de la suspensión

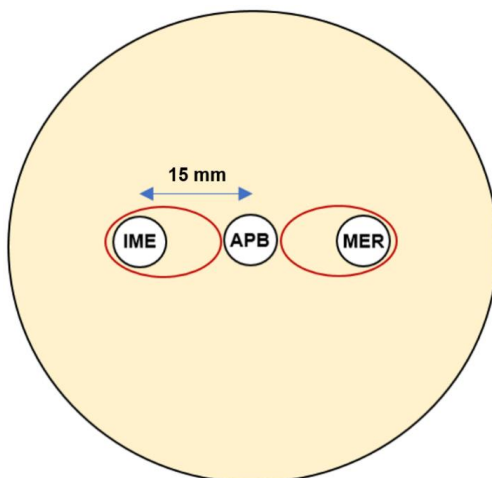
1. A partir de una cepa inoculada en TSA de 18-24 horas, se toma una UFC con un asa recta y se realiza una suspensión del microorganismo en solución salina al 0.85%.
2. Se ajusta la turbidez del inóculo a la escala 0.5 McFarland.

Inoculación del Müller Hinton

1. Inocular sobre placas de agar Mueller Hinton, de forma confluyente con una suspensión de *K. pneumoniae* de los aislamientos hospitalarios, en la escala de McFarland 0.5, equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml.
2. Colocar en el centro de la placa inoculada, un disco conteniendo Ácido fenil borónico (APB) (300 μ g), inhibidor de betalactamasas de tipo A.
3. Ubicar discos de Imipenem (IMI) (10 μ g) y Meropenem (MER) (10 μ g) a 15 mm de distancia borde a borde del disco conteniendo APB. Ver figura N°13.

Interpretación:

La deformación del halo producido entre los carbapenemes y el ácido borónico, indica que hay sinergismo, este fenómeno es conocido como “efecto huevo”. se considera un resultado positivo y por lo tanto se sospecha la presencia de β -lactamasas de tipo KPC (Ver figura N° 14).⁽²³⁾



APB: Ácido fenil bóronico, **MER:** Meropenem, **IMI:** Imipenem

Figura N° 14 Ensayo fenotípico de difusión de doble disco para detección de KPC, Autoría propia.

4.4.2 Detectar los genes codificantes de KPC (*bla_{KPC}*) en los aislamientos en estudio mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Extracción de ADN total. ⁽⁵⁹⁾ (ver anexo N°4)

1. Obtener cultivos puros a partir de cada uno de los aislamientos hospitalarios en medio: Luria Bertani Agar (LBA) + Ceftazidima (CAZ) (20 µg/mL), incubar 24 h a 37°C.
2. Resuspender 2-4 colonias aisladas en 200 µl de agua desionizada estéril y someter a un baño de agua en ebullición durante 10 minutos.
3. Centrifugar durante 2 minutos a 13,000 rpm en microcentrífuga.
4. Conservar los sobrenadantes a -20°C para su posterior utilización.

Extracción de ADN plasmídico. ⁽⁵⁹⁾ (Ver anexo N°5)

1. Centrifugar 3 ml de un cultivo de 16-18 horas en caldo Luria Bertani (LB), a 13.000 RPM en microcentrífuga durante 2 minutos.
2. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 ml de Buffer E.

3. Agregar a la suspensión bacteriana 2 ml de solución de lisis suplementada con 20 µg de RNasa. Mezclar suavemente por inversión.
4. Incubar a 58°C durante 20 minutos.
5. Añadir 1 ml de mezcla de fenol-cloroformo-isoamilico (24:24:1). Mezclar utilizando vortex.
6. Centrifugar 15 minutos a 13.000 RPM.
7. Transferir la fase acuosa, que contiene el ADN plasmídico, colocando 400µl en tubos para microcentrífuga.
8. Añadir 40 µl de NaCl 5M (Concentración final: 0,3-0,5 M) y 800 µl (2 volúmenes) de etanol 96%.
9. Incubar durante 16-18 horas a -20 °C para que precipite el ADN plasmídico.
10. Centrifugar a 13.000 RPM en microcentrífuga durante 15 minutos.
11. Lavar con 1 ml de etanol 70%. No mezclar ni remover el pellet, y volver a centrifugar como en el paso 10.
12. Extraer el alcohol y dejar secar el pellet a temperatura ambiente.
13. Resuspender en 50-100 µl de agua desionizada estéril.

Amplificación génica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (ver anexo N°6).^(8, 35)

La detección de los *bla_{KPC}* presentes en los aislamientos en estudio se realizó mediante amplificación por PCR simple con oligonucleótidos (primers) específicos propuesta por Bradford ⁽⁸⁾ utilizando como molde ADN total y ADN plasmídico.

1. Preparar la mezcla de PCR (master mix) según la Tabla N°2 en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, homogenizar bien y evitar la formación de burbujas.

2. Rotular tubos de microcentrífuga de 0.2ml con las muestras a analizar.
3. Dispensar en los tubos de reacción rotulados 22.5 μ L de mezcla de PCR (de acuerdo a lo indicado en la tabla N°2).
4. Agregar en cada tubo la cantidad de 2.5 μ L de ADN según la Tabla N°2
5. Homogenizar suavemente dentro del tubo subiendo y bajando el líquido con la punta de la micropipeta.
6. Colocar dentro del termociclador y programar el proceso, según indicaciones de la tabla N°4 para 30 ciclos.

Tabla N° 2 Preparación de mezcla de PCR Simple *bla*_{KPC}-(8, 35)

Reactivo	Concentración	Concentración final en la Reacción	Cantidad para un tubo (μ L)	Cantidad para 20 tubos (μ L)
Buffer	10X	1X	2.5	50
MgCl₂	25 mM	25 μ M	2.5	50
dNTPs	10 mM (Todos) ^{*1}	10pM	1.0	20
Oligonucleótido Forward (Primer F)	10 μ M	10pM	2.5	50
Oligonucleótido Reverse (Primer R)	10 μ M	10pM	2.5	50
Enzima (Taq Pol)	5U/ μ L	1U/ μ L	0.2	4
Agua desionizada estéril	-	-	11.3	226
ADN (Total o Plásmidico)^{*2}	0.1 mg/mL	0.1ng genómico (máximo 500 ng; de bacteria de 1 a 10 ng y si es plásmido de 0.1 a 1 ng)	2.5	Cada tubo ^{*3}
TOTAL			25 μ L	-

*Notas:

1. La concentración de los dNTPs a 10 mM, se refiere a la suma de los 4 dNTPs, y cada uno está a 2.5mM.
2. La PCR debe realizarse a partir de templado de ADN total obtenido a partir de lisis de colonia, así como ADN plasmídico.
3. Se agrega el ADN a cada tubo conteniendo la mezcla previamente homogenizada

Tabla N° 3 Oligonucleótidos (primers) utilizados en PCR Simple *bla_{KPC}*. (8, 54)

Oligonucleótido 5'-3'	Secuencia 5'-3'	Amplicon esperado	T° de Apareamiento	Uso
KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	890-bp	55 °C	PCR Simple <i>bla_{KPC}</i>
KPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCC			

Tabla N° 4 Condiciones generales para la PCR Simple *bla_{KPC}*. (8, 64)

PROCESO		TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización Inicial		95 °C	5 min
Amplificación (30 Ciclos)	Desnaturalización	95 °C	1 min
	Apareamiento /Hibridación	55 °C	1 min
	Elongación	72 °C	1 min
Extensión Final		72 °C	10 min

Visualización de los productos amplificados en la PCR Simple *bla_{KPC}* (ver anexo N°7)

1. Preparar la agarosa al 0.8%, para ello fundir la agarosa en Buffer TAE 1X (Ver preparación de agarosa en anexo N°7)
2. Homogenizar agitando suavemente evitando la formación de burbujas.
3. Dejar enfriar hasta una temperatura de 45° a 50° aprox.
4. Colocar el Bromuro de Etidio a una concentración de 0.5 µg/ml y agitar suavemente para homogenizar. *Nota: El bromuro de etidio es un mutágeno y es altamente tóxico, por lo cual se deben tomar las debidas medidas de seguridad necesarias para su uso y el descarte del gel de agarosa.
5. Preparar el contenedor de geles o molde de geles, con el peine para que se formen los pocillos donde se depositan las muestras.
6. Verter la agarosa sobre el molde, verificando que no queden burbujas, de ser así quitarlas rápidamente con las puntas para pipetas.

7. Dejar reposar durante 20 min - 30 min, hasta que el gel presente un color blanquecino.
8. Retirar el peine del molde con cuidado para no romper el fondo de los pocillos.
9. Colocar el contenedor de geles con el gel solidificado dentro de la cámara de electroforesis.
10. Verter suavemente el buffer de corrida tris acetatos EDTA (TAE 1X)
11. Colocar 1 μ L de buffer de carga sobre una bandeja de mezclado.
12. Mezclar 9 μ L del producto de PCR obtenido con 1 μ L de colorante de corrida o buffer de carga, con cuidado de no hacer burbujas mezclar subiendo y bajando con la pipeta.
13. Colocar la punta de la pipeta dentro del pocillo en el gel, sin romperlo y lentamente vaciar la pipeta para cargar el gel. Evitar llenar el pocillo hasta arriba.
14. Colocar el marcador de peso molecular, dos controles positivos (Mezcla de PCR + ADN *Klebsiella pneumoniae* ST258 y ST253) y el control negativo. (Mezcla de PCR+Agua desionizada estéril)
15. Verificar la polaridad en la que se encuentra colocado el gel (el ADN migrará al polo positivo ya que los fosfatos de la molécula le confieren carga negativa, por lo que hay que asegurarse que la corrida del gel sea hacia el polo positivo.)
16. Correr la electroforesis del gel a 90 volts por 30 min
17. Al terminar la corrida de electroforesis, tomar el gel de agarosa cuidadosamente para evitar romperlo.
18. Colocarlo sobre el transiluminador UV para verlo. La luz UV puede dañar la piel y los ojos, por lo que será necesario proteger la cara y/o los ojos.
19. Tomar una fotografía del gel.
20. Descartar el gel según el protocolo de descarte para cancerígenos y mutagénicos.

4.4.3 Establecer posibles relaciones de clonalidad entre los microorganismos productores de KPC, mediante la utilización de enzimas de restricción del genoma en conjunto con electroforesis de campo pulsado (PFGE) y por medio de tipificación multilocus de secuencias (MLST).

Macrorrestricción del genoma de *K. pneumoniae* con XbaI seguido por electroforesis de campo pulsado (PFGE). ⁽⁴²⁾

Preparación de los tacos o soportes “Plugs” de agarosa (Ver anexo N°8)

1. A partir de un cultivo en placa de 18 a 24 h, inocular una colonia en 5 ml de Infusión cerebro corazón (BHI) e incubar 16-18 h sin agitación a 37°C.
2. Colocar 1000 µl del cultivo en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y centrifugar a 12.000 RPM en microcentrífuga por 2 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante con pipeta automática y resuspender el “pellet” bacteriano con 1000 µl de buffer PIV. Centrifugar nuevamente, descartar el sobrenadante eliminando todo el líquido posible.
4. Resuspender el “pellet” bacteriano con 200 µl de buffer PIV (considerar que este volumen inicial es de 210 µl).
5. Colocar 5 µl de la suspensión bacteriana en una cubeta o celda descartable del espectrofotómetro conteniendo 1 ml de PIV (dilución 1:200). Cubrir la cubeta con parafilm y homogenizar bien.
6. Medir la densidad óptica (DO) a 620 nm, empleando PIV como blanco. La DO debería ser 0.05 - 0.15.

Calcular el volumen de PIV necesario a agregar a la suspensión bacteriana, para alcanzar una DO_{620} de 5 unidades, según la siguiente fórmula:

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

En donde:

DOmedida = Densidad Óptica Medida

40 = Constante

210 = Constantes

Tabla N° 5 Cálculo de PIV a partir de la densidad óptica (DO)

DO medida	Volumen PIV a agregar (ml)	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	-

7. Limpiar los moldes para la solidificación de la mezcla de los plugs de agarosa (cubiertos con parafilm) con alcohol 70%. Transferir 150 µl de la suspensión bacteriana ($DO_{620}= 5$ unidades) a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, e incubar por 10 minutos a 50°C. Agregar a la suspensión bacteriana, 150 µl de agarosa de bajo punto de fusión 1.6%, precalentada a 50°C y mezclar rápidamente con vortex.
8. Pipetear la mezcla en los moldes de los plugs y dejar solidificar a T° ambiente.
9. Refrigerar a 4°C los plugs de agarosa en los moldes durante 45 minutos.

Lisis celular de los plugs de agarosa:

10. Remover cuidadosamente los plugs con un asa descartable y colocarlos en tubos de 15 ml conteniendo 1 ml de Buffer de Lisis. Incubar 16-18 horas a 37°C.
11. Reemplazar el buffer de Lisis por Buffer ES-P. Incubar los plugs 24 h a 50°C.

Lavados de los plugs de agarosa:

12. Lavar los plugs con Buffer TE 1X (TE con 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo) para eliminar la proteinasa K. Realizar este procedimiento al menos 5 veces, dejando actuar cada lavado al menos 30 minutos con agitación horizontal.
13. Lavar 3 veces con Buffer TE 0.1X dejando actuar cada lavado al menos 30 minutos con agitación horizontal. Los plugs se pueden conservar a 4°C hasta 3-4 meses.

Equilibrio y digestión de plugs con *Xba*I:

14. Equilibrar los plugs con 500 µl del Buffer 1X apropiado para la enzima de restricción a utilizar. (En este caso *Xba*I) Incubar a temperatura ambiente durante 2-3 h.
15. Añadir 30 U/µl de *Xba*I e incubar durante 20 h a 25°C.
16. Colocar los plugs dentro del gel de corrida (agarosa para PFGE al 0,8% o 1% en Buffer TBE 1X)
17. Corrida del gel: pulsos de 5 a 60 segundos durante 20 horas a 6 Volts/cm

Teñido del gel:

18. 100 µL de bromuro de etidio en 500 mL de agua desionizada y sumergir el gel cuidadosamente por 5 min.

19. Sumergir en agua desionizada por 30 min para lavar el exceso de bromuro de etidio.

Interpretación de patrones de bandas por medio de herramientas bioinformáticas

- **Altamente relacionado:** Un aislamiento se considera altamente relacionado a una cepa si se diferencia de esta con 2 o 3 bandas
- **Posiblemente relacionado:** Un aislamiento se considera posiblemente relacionado si se diferencia por 4 a 6 bandas.
- **No relacionado o distinto:** Un aislamiento se considera distinto si se diferencia por 7 o más bandas.

Construcción del dendograma

A partir de los patrones de bandas obtenidos en el PFGE se generó una matriz binaria, colocando el valor de cero (0) para la ausencia de una banda dentro de la calle o el valor de uno (1) para la presencia de una banda dentro de la calle; la matriz binaria generada fue digitada en el software TREECON₍₆₇₎ para poder obtener una matriz de similitud, con lo que se construyó un dendograma utilizando el algoritmo Unweighted Pair Group Method Arithmetic Averages (UPGMA, Método de grupo de pares no ponderados con media aritmética). La construcción de dicho dendograma permite agrupar a los aislamientos por similitud y establecer una relación clonal.

Estudio de MLST (Multilocus sequence typing)

Es una técnica genética para la caracterización taxonómica de bacterias y microorganismos por debajo del nivel de especie. El procedimiento caracteriza muestras de especies microbianas mediante la secuenciación de ADN de fragmentos internos de genes de mantenimiento. Se le asigna un número particular de alelo a cada secuencia única que se encuentre en un gen de

Tabla N°6 (Continuación)

Sitio	Función propia del gen	Secuencia del oligonucleótido (primer) ^{a, b}	Tamaño (bp)
mdh	Malate dehydrogenase	mdh130: CCC AAC TCG CTT CAG GTT CAG mdh867: CCG TTT TTC CCC AGC AGC AG	477
pgi	Phosphoglucose isomerase	pgi1F: GAG AAA AAC CTG CCT GTA CTG CTG GC pgi1R: CGC GCC ACG CTT TAT AGC GGT TAA T pgi2F(seq): CTG CTG GCG CTG ATC GGC AT pgi2R(seq): TTA TAG CGG TTA ATC AGG CCG T	432
phoE	Phosphoporine E	phoE604.1: ACC TAC CGC AAC ACC GAC TTC TTC GG phoE604.2: TGA TCA GAA CTG GTA GGT GAT	420
infB	Translation initiation factor 2	infB1F: CTC GCT GCT GGA CTA TAT TCG infB1R: CGC TTT CAG CTC AAG AAC TTC infB2F(seq): ACT AAG GTT GCC TCC GGC GAA GC	318
tonB	Periplasmic energy transducer	tonB1F: CTT TAT ACC TCG GTA CAT CAG GTT tonB2R: ATT CGC CGG CTG RGC RGA GAG	414

a Los primer de secuenciación fueron los mismos que los primer de PCR, excepto cuando se indicó.

b Basado en la secuencia completa de la cepa MGH78578

El procedimiento utilizado fue el descrito en 4.4.2 apartado *Amplificación génica por reacción en cadena de la polimerasa para PCR Simple bla_{KPC}* utilizando las condiciones de PCR siguientes:

Tabla N° 7 Condiciones generales para la PCR MLST⁽¹⁰⁾

Proceso		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial		95 °C	5 min
Amplificación (30 Ciclos)	Desnaturalización	95 °C	1 min
	Apareamiento /Hibridación	50 °C ¹	1 min
	Elongación	72 °C	30 seg
Extensión Final		72 °C	10 min

1: Cambiar la temperatura de apareamiento para gapA a 60°C y tonB a 45°C

Visualización de los productos amplificados en la PCR MLST

Para el procedimiento ver *Visualización de los productos amplificados en la PCR Simple bla_{KPC}* del apartado 4.4.2

Los productos amplificados en la reacción de PCR se observaron en geles de agarosa al 1.5% en buffer TAE, y se utilizó como colorante bromuro de etidio al 0.5 µg/ml, posteriormente los geles se visualizaron con un transiluminador UV.

Se comprobó que el producto de PCR fuera único, y se tomó un aislamiento representante por cada grupo identificado mediante el dendograma y se envió a secuenciar (Macrogen Inc-Corea).

4.4.4 Determinar los elementos genéticos involucrados en la diseminación horizontal de resistencia, a través del estudio de la asociación a elementos genéticos móviles como transposones y la tipificación de los plásmidos portadores de *bla_{KPC-2}*.

Caracterización del entorno genético de los *bla_{KPC-2}* (67)

Para realizar la caracterización del entorno genético del gen *bla_{KPC}* (ubicado en el transposón Tn4401, ver fig. N°10), se realizaron cuatro reacciones de PCR principales que abarcan las porciones adyacentes al gen como se muestra en la figura N° 15.

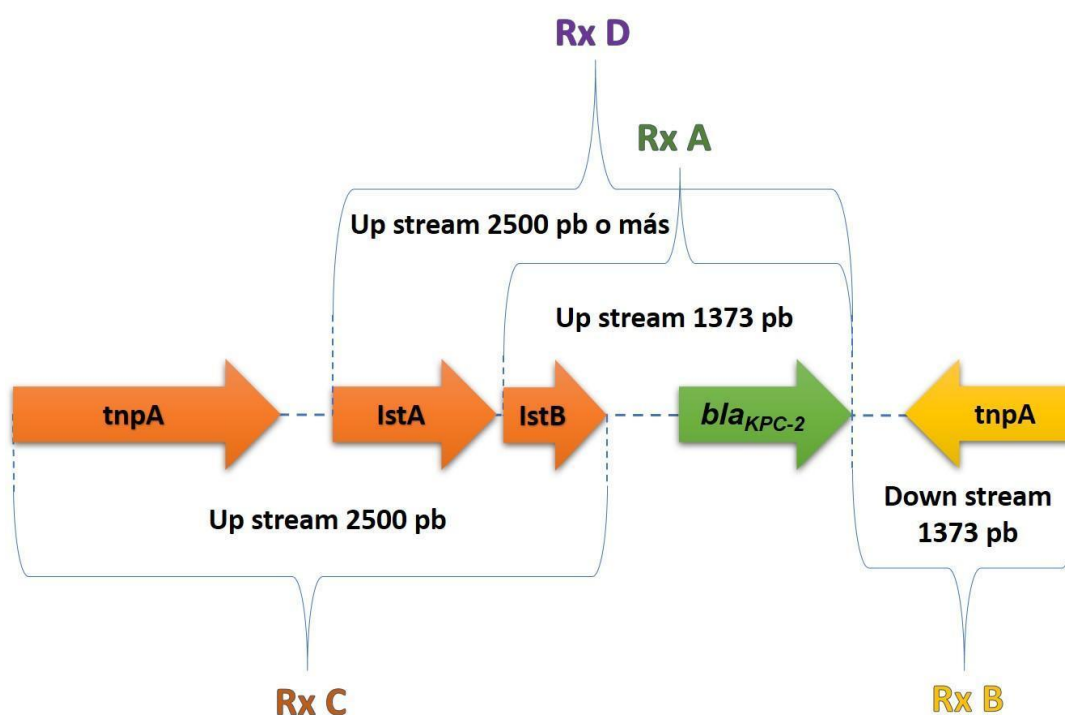


Figura N° 15 Esquema de reacciones para la caracterización del entorno genético de los *bla_{KPC-2}*, autoría propia.

El procedimiento para realizar las PCR de caracterización del entorno genético utilizado fue el descrito en el apartado 4.4.2 *Amplificación génica por reacción en cadena de la polimerasa para PCR Simple bla_{KPC}* utilizando la preparación de mezclas descritas en la tabla N°8, el uso de los primers descritos en la tabla N°9 y bajo las condiciones de PCR indicadas en la tabla N° 10 para cada una de las reacciones respectivamente.

Tabla N° 8 Preparación de mezclas de PCR para las reacciones del entorno genético: Rx A (up stream), Rx B (down stream), Rx C (up stream) y Rx D (up stream)

Reactivo	Rx A Up Stream (μ L)	Rx B Down Stream (μ L)	Rx C Up Stream (μ L)	Rx D Up Stream (μ L)
Buffer	2.5	2.5	2.5	2.5
MgCl ₂	2.0	2.0	2.5	2.5
dNTPs	1.0	1.0	1.5	1.5
Oligonucleótido Forward (Primer F)	2.5	2.5	2.5	2.0
Oligonucleótido Reverse (Primer R)	2.5	2.5	2.5	2.0
Enzima (Taq Pol)	0.2	0.2	0.3	0.4
Agua desionizada estéril	11.8	11.8	10.7	11.6
ADN (Total o Plásmidico) *1	2.5	2.5	2.5	2.5
TOTAL	25	25	25	25

1. La PCR debe realizarse a partir de templado de ADN total obtenido a partir de lisis de colonia, así como ADN plasmídico. Se agrega el ADN a cada tubo conteniendo la mezcla previamente homogenizada

Tabla N° 9 Oligonucleótidos (Primers) para PCR del entorno genético: Rx A (up stream), Rx B (down stream), Rx C (up stream) y Rx D (up stream).

Reacción de PCR	Oligonucleótido 5'-3'	Secuencia 5'-3'	Amplicon esperado	T° de apareamiento
Rx A Up stream	3098-F	TGACCCTGAGCGGCGAAAGC	1373-bp	58 °C
	KPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC		
Rx B Down stream	KPC-F	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	1373-bp	55 °C
	4714-R	GAAGATGCCAAGGTCAATGC		
Rx C Up stream	816V-F	CTTAGCAAATGTGGTGAACG	2500-bp	64 °C
	IstB-R	GCTTTCTTGCTGCCGCTGTG		
Rx D Up stream	816V-F	CTTAGCAAATGTGGTGAACG	2500-bp o más	60°C
	KPC-R	TTTTCAGAGCCTTACTGCCC		

Tabla N°10 Condiciones generales para la PCR del entorno genético: Rx A (up stream), Rx B (down stream), Rx C (up stream) y Rx D (up stream)

PROCESO		Rx A Up Stream		Rx B Down Stream		Rx C Up Stream		Rx D Up Stream	
		T° (°C)	t (min)	T° (°C)	t (min)	T° (°C)	t (min)	T° (°C)	t (min)
Desnaturalización Inicial		94	4	94	4	94	4	94	4
Amplificación (30 Ciclos)	Desnaturalización	94	1	94	1	94	1	94	1
	Apareamiento /Hibridación	58	1	55	1	64	2.5	60	1
	Elongación	72	2	72	2	72	2.5	72	2.4
Extensión Final		72	10	72	10	72	10	72	10

Visualización de los productos amplificados en las PCR del entorno genético: Rx A (up stream), Rx B (down stream), Rx C (up stream) y Rx D (up stream)

Para el procedimiento ver *Visualización de los productos amplificados en la PCR Simple bla_{KPC}* del apartado 4.4.2

Los productos de amplificación se observaron en agarosa al 1.5 % en buffer TAE con una electroforesis a 90 volts durante 30 minutos (Rx A , Rx B y Rx C) y agarosa al 0.8 % en buffer TAE con una electroforesis a 90 volts durante 30 minutos (Rx D).

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0.5 µg/ml. Posteriormente fueron visualizados con un transiluminador UV.

Tipificación de los plásmidos portadores de *bla_{KPC}* por determinación de grupos de incompatibilidad ⁽¹²⁾

El método de tipificación basado en PCR: inc/rep PCR, consta de 18 pares de primers, diseñados para realizar 5 multiplex PCR y 3 simplex PCR, los cuales

reconocen los siguientes replicones: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I α , L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F y FIIA. ⁽¹²⁾

El procedimiento de PCR para la tipificación de los plásmidos portadores de *bla_{KPC}* por determinación de grupos de incompatibilidad utilizado fue el descrito en el capítulo 4.4.2 apartado *Amplificación génica por reacción en cadena de la polimerasa para PCR Simple bla_{KPC}*, para la preparación de mezclas de multiplex PCR y simplex PCR se realizó la preparación previa de una mezcla “Primer Mix”, debido a que estas PCR son de tipo múltiple por lo que requieren 6 primers para las Multiplex y 2 primers para las simplex (Ver tabla N° 13), se utilizó la preparación de mezcla de multiplex PCR y simplex PCR descrita en la tabla N°11, bajo las condiciones de PCR indicadas en la tabla N° 12 para cada una de los grupos de incompatibilidad.

Preparación de Mezcla “Primer Mix”

Para la preparación de la Primer Mix se debe tener en cuenta los siguientes cuidados.

- La concentración final de cada primer debe ser de 1 en 10 partiendo de la solución madre del primer.
- La Primer mix para las Multiplex PCR debe contener 6 primers. (Ver tabla N° 13)
- La Primer mix para las Simplex PCR contiene solo 2 primers. (Ver tabla N° 13)

Para 100 μ L de Primer Mix

1. Adicionar 10 μ L de cada primer en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y llevar a un volumen final de 100 μ L con agua desionizada estéril.

Ejemplo: Para primer mix Multiplex 1

Adicionar: 10 μ L HI1 FW + 10 μ L HI1 RV
 10 μ L HI2 FW + 10 μ L HI2 RV
 10 μ L I1 FW + 10 μ L I1 RV
 40 μ L de agua desionizada estéril

Ejemplo: Para primer mix Simplex PCR

Adicionar: 10 μ L FrepB FW + 10 FrepB RV
 80 μ L de agua desionizada estéril

2. Homogenizar el tubo de microcentrífuga por medio de inversión suavemente.
3. Utilizar esta mezcla primer mix, para adicionar en la mezcla de preparación mezcla de multiplex PCR para grupos de incompatibilidad descrita en la tabla N° 11

Tabla N°11 Preparación de mezcla de multiplex PCR y simplex PCR para grupos de incompatibilidad

Reactivo	Multiplex PCR y Simplex PCR (μ L)
Buffer	2.5
MgCl ₂	2.0
dNTPs	1.0
Oligonucleótidos Mix (Primer Mix) ¹	2.5
Enzima (Taq Pol)	0.2
Agua desionizada estéril	14.3
ADN (Total o Plásmidico)	2.5
TOTAL	25

1: El Primer Mix debe cambiarse según la reacción de Multiplex PCR o Simplex PCR que se realice, ver *Preparación de Mezcla "Primer Mix"* y *Tabla N°11*

Tabla N° 12 Condiciones generales para las multiplex PCR y simplex PCR para grupos de incompatibilidad

PROCESO		Multiplex PCR		PCR Simplex	
		T°	t	T°	t
Desnaturalización Inicial		94 °C	5 min	94 °C	4 min
Amplificación (30 Ciclos)	Desnaturalización	94 °C	1 min	94 °C	1 min
	Apareamiento /Hibridación	60 °C	30 seg	55 °C	1 min
	Elongación	72 °C	1 min	72 °C	2 min
Extensión Final		72 °C	5 min	72 °C	10 min

Tabla N°13 Oligonucleótidos (Primers) para las Multiplex PCR y Simplex PCR para la determinación de incompatibilidad de plásmidos

Reacción de PCR	Oligonucleótido 5'-3'	Secuencia 5'-3'	Amplicon esperado (pb)	T° de Apareamiento °C
Multiplex PCR 1	HI1 FW	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471	60
	HI1 RV	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA		
	HI2 FW	TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC	644	
	HI2 RV	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT		
	I1 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139	
	I1 RV	TCGTGTTCCGCCAAGTTCGT		
Multiplex PCR 2	X FW	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376	60
	X RV	TGAGAGTCAATTTTATCTCATGTTTATAGC		
	L/M FW	GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG	785	
	L/M RV	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG		
	N FW	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559	
	N RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC		
Multiplex PCR 3	FIA FW	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462	60
	FIA RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG		
	FIB FW	GGAGTCTGACACACGATTTTCTG	702	
	FIB RV	CTCCGTCGCTTCAGGGCATT		
	W FW	CCTAAGAACAACAAAGCCCCG	242	
	W RV	GGTGCGGGCATAGAACCGT		

Tabla N°13 (Continuación)

Multiplex PCR 4	Y FW	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765	60
	Y RV	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT		
	P FW	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534	
	P RV	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC		
	FIC FW	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262	
	FIC RV	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT		
Multiplex PCR 5	A/C FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465	60
	A/C RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT		
	T FW	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750	
	T RV	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC		
	FIIS FW	CTGTCGTAAGCTGATGGC	270	
	FIIS RV	CTCTGCCACAAACTTCAGC		
PCR Simples	FrepB FW	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270	52
	FrepB RV	GAAGATCAGTCACACCATCC		
	K/B FW	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC	K/B FW con K RV: 160 pb	60
	K RV	TCTTTCACGAGCCC GCCAAA		
	B/O RV	TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA		

Visualización de los productos amplificados en las multiplex PCR y simplex PCR para grupos de incompatibilidad.

Para el procedimiento ver *Visualización de los productos amplificados en la PCR Simple bla_{KPC}* del apartado 4.4.2

Los productos de amplificación se observaron en agarosa al 1.5 % en buffer TAE con una electroforesis a 90 volts durante 30 minutos tanto para las multiplex PCR como las Simplex PCR.

Posteriormente los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0,5 µg/ml. Los geles fueron visualizados con un transiluminador UV.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Determinación de la sensibilidad^(25,63)

Este procedimiento se realizó en el Hospital Alemán de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina, acorde a las tablas presentadas por el CLSI para los puntos de corte de los halos de inhibición y concentración mínima inhibitoria para enterobacteria, Tabla 2A-1⁽¹⁷⁾ en aislamientos de muestras clínicas y cultivos de vigilancia de pacientes ingresados en la UCI, mediante el Sistema de identificación microbiana completamente automatizado Vitek 2 Compact.

En la tabla N°14 se puede observar la codificación asignada a los 24 aislamientos proporcionados por el Hospital Alemán obtenidos por el sistema de identificación automatizado.

Tabla N° 14 Codificación de aislamientos

Código de aislamiento	Tipo de muestra	Fecha de aislamiento	Especie del Aislamiento
1	Hisopado anal	13/01/2017	No <i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	Orina sonda nueva	12/01/2017	No <i>Klebsiella pneumoniae</i>
3	Hisopado anal	12/12/2016	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
4	Hisopado anal	06/01/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5	Orina sonda nueva	11/01/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	Hisopado anal	03/02/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7	Absceso traqueal	02/01/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8	Hisopado anal	03/01/2017	No <i>Klebsiella pneumoniae</i>
9	Orina sonda nueva	16/12/2016	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Tabla N° 14 (Continuación)

10	Espuito	24/01/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
11	Hisopado anal	30/12/2016	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
12	Orina sonda nueva	23/12/2017	No <i>Klebsiella pneumoniae</i>
13	Hisopado anal	22/12/2016	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
14	Hisopado anal	10/01/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
15	Hisopado anal	09/01/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
16	Hisopado anal	03/01/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
17	Orina chorro medio	04/01/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
18	Líquido de punción abdominal	02/02/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
19	Absceso traqueal	23/12/2016	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
20	Orina chorro medio	08/11/2016	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
21	Orina chorro medio	10/01/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
22	Hemocultivo	19/01/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
23	Hisopado anal	04/01/2017	No <i>Klebsiella pneumoniae</i>
24	Líquido de punción abdominal	09/02/2017	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Estos aislamientos no se tomaron en los resultados por qué no cumplieron con las características fenotípicas de *Klebsiella pneumoniae*.

Dentro de la tabla N°14 se observó que solamente 19 de estos aislamientos correspondían a la especie *Klebsiella pneumoniae* representado el 79.2% de los aislamientos recibidos; el 20.8% de los aislamientos detectados diferían de la especie *Klebsiella pneumoniae* por lo que no fueron considerados como parte de los resultados de este estudio puesto que no están contemplados dentro de los objetivos, pero para efectos de información de investigación interna del

laboratorio de resistencia bacteriana se decidió realizar las determinaciones para esos aislamientos.

Para facilitar la interpretación de la información proporcionada por la tabla N°14 sobre el tipo de muestra de donde se obtuvieron los aislamientos para el estudio se realizó la figura N° 16



Figura N°16 Tipos de muestra

Donde se puede observar que 8 de los tipos de muestras, equivalentes al 42.1% provienen de un hispado anal, que es una de las principales zonas donde se ubican la especie de *Klebsiella pneumoniae* siendo este un patógeno oportunista, que causa infecciones urinarias y extra intestinales en pacientes comprometidos.

Caracterizándose esta especie por poseer una resistencia natural a las aminopenicilinas debido a la presencia de una β -lactamasa cromosómica.

Conociendo la especie de los aislamientos brindados por el Hospital Aleman se elaboró el perfil de resistencia para los 19 aislamientos como se detalla en la tabla N° 15.

Tabla N° 15 Perfil de resistencia determinado por sistema automatizado Vitek

AISLAMIENTO	3	4	5	6	7	9	10	11	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	24
NOMBRE DEL MICROORGANISMO	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU	KLE BPN EU
ANTIBIÓTICO	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR	SIR
(AMK) Amikacina	S	S	S	I	S	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	I	I	I	S
(GEN) Gentamicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
(AMS) Ampicilina-Sulbactam	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
(TZP) Piperacilina-Tazobactam	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
(AMP) Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
(CFZ) Cefazolina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
(CFX) Cefalexina	NE	NE	R	NE	NE	R	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	R	R	NE	NE
(CRO) Ceftriaxona	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
(CAZ) Ceftazidima	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
(FEP) Cefepime	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
(IPM) Imipenem	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
(MEM) Meropenem	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
(ETP) Ertapenem	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
(CIP) Ciprofloxacina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
(LVX) Levofloxacina	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	I	I	I	R	R	R	R	S
(NIT) Nitrofurantoína	NE	NE	R	NE	NE	R	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	R	R	NE	NE
(SXT) Trimetoprim-Sulfametoxazol	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S

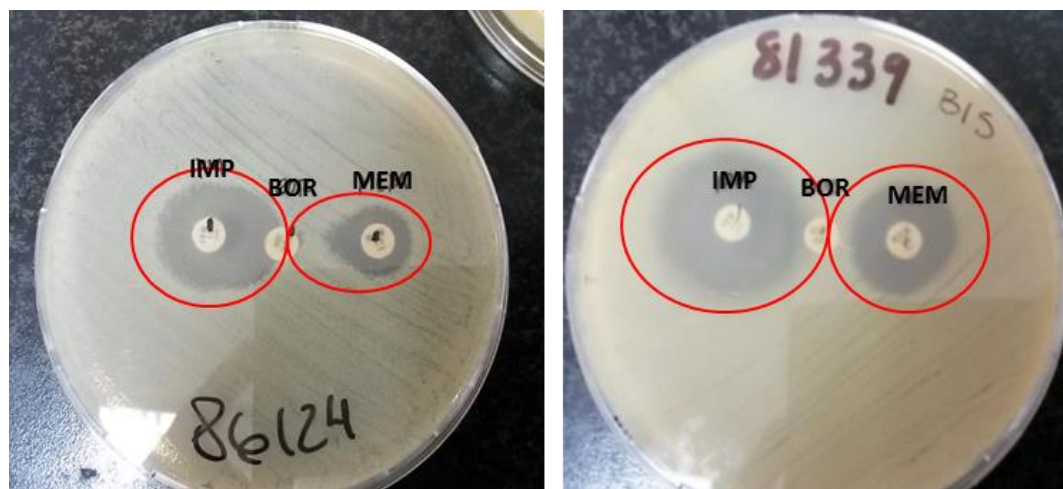
NE: No evaluado **S:** Sensible, **I:** Intermedio, **R:** Resistente **KLEBNEU:** *Klebsiella pneumoniae*

 Estos antibióticos representan la familia de los carbapenemes

Tomando en cuenta los datos proporcionados por la tabla N°15 del perfil de resistencia por sistema automatizado Vitek, se verificó la resistencia a carbapenemes en el 100.0% de aislamientos seleccionados, esta resistencia es de gran importancia debido a que los carbapenemes son los antibióticos utilizados como último recurso de tratamiento en pacientes con infecciones multirresistentes, razón que permitió fueran seleccionados dichos aislamientos para realizar el estudio y así dar paso a las siguientes determinaciones fenotípicas y genotípicas para el cumplimiento de los objetivos del mismo.

5.1 Identificación fenotípica de la presencia de β -lactamasas de tipo KPC mediante ensayos de difusión en medio sólido.

Para poder confirmar la presencia de β -lactamasas de tipo KPC en los aislamientos en estudio fue necesario desarrollar una identificación fenotípica por el método de difusión en medio sólido como se observa en la figura N° 17.



IPM=Imipenem BOR=Ácido fenil borónico MEM=Meropenem

Figura N° 17 Ensayo de detección fenotípica de β -lactamasas, formación de halos sinérgicos positivos empleando discos conteniendo BOR (300 μ g).

En la figura N° 17 se muestran 2 antibiogramas representativos que corresponden a 2 de los aislamientos de *K. pneumoniae* incluidos en este estudio. Presentando los 19 aislamientos una prueba de sinergia positiva que se observa mediante el agrandamiento en el halo de inhibición de IPM y MEM en la zona adyacente al disco que contiene BOR, la presencia del fenómeno del efecto huevo en los 19 aislamientos en estudio es compatible con la sospecha de producción de una β -lactamasa de tipo KPC.

Considerando que existen 20 variantes de KPC según el NCBI, la variante de KPC-2, inicialmente de *Klebsiella spp.* es la enzima de tipo KPC más comúnmente detectada en *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas spp.*

La confirmación de esta variante para los aislamientos en estudio se realizó mediante la detección de los genes codificantes de KPC.

5.2 Detección de los genes codificantes de KPC (bla_{KPC}) en los aislamientos en estudio mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Extracción de ADN

Se realizaron dos tipos de extracción de ADN, la extracción de ADN Total, por medio de lisis celular con temperatura y extracción de ADN plasmídico, mediante el método de Kadu-Liu.

Se realizaron pruebas de PCR de identificación del gen KPC (bla_{KPC}) para seleccionar el tipo de ADN a utilizar en el desarrollo de las pruebas del estudio, los resultados obtenidos para ambas PCR se muestran en la Figura N°18.

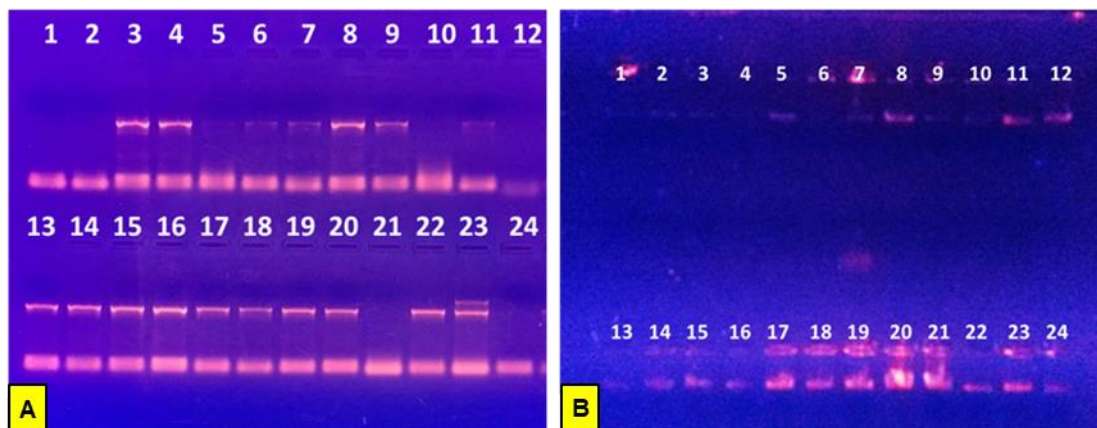


Figura N° 18 Amplicones obtenidos por PCR KPC simple.
A. PCR utilizando ADN Total, **B.** PCR utilizando ADN Plasmídico, los números dentro de las imágenes representan resultados de PCR obtenido a partir de los correspondientes aislamientos.

La figura N° 18 se observa en el literal A que al utilizar ADN total mejora la resolución de los geles visto en el transiluminador UV, disminuyendo la posibilidad de obtener resultados poco confiables, por lo cual se seleccionó el uso de ADN total como molde para las pruebas de PCR. Al mismo tiempo en el literal B se observa una menor resolución en la imagen debido a las bajas concentraciones de ADN plásmidico extraído por el método de Kadu-Liu.

Detección de *bla_{KPC}* por amplificación génica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La detección de los *bla_{KPC}* presentes en los aislamientos en estudio se realizó mediante amplificación por PCR simple, los resultados se muestran en la figura N°19 y tabla N°16.

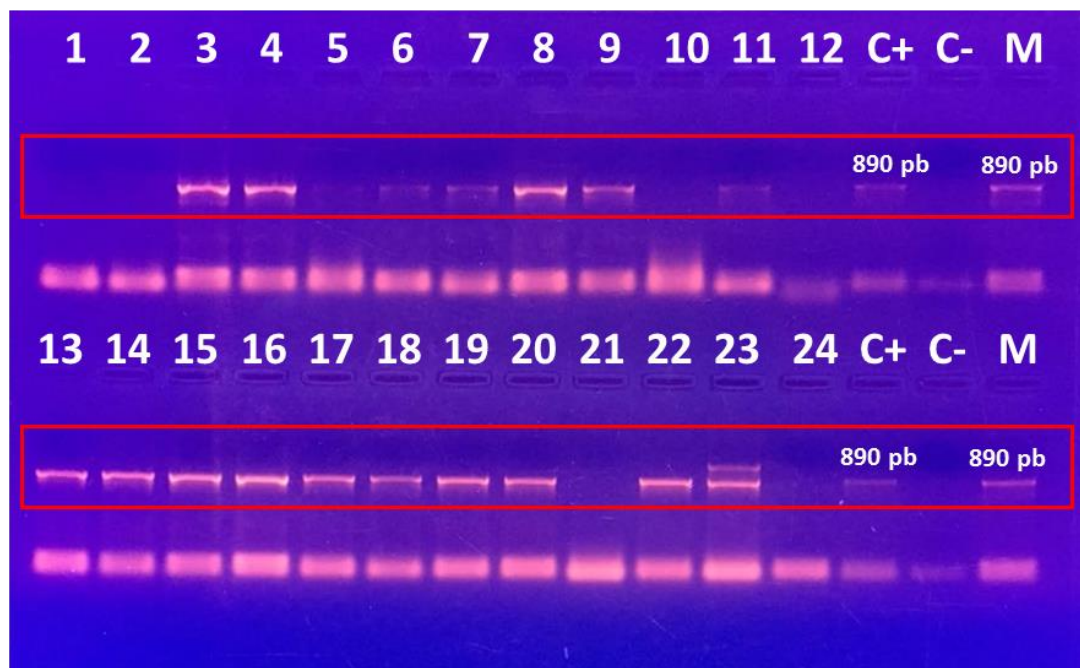


Figura N° 19 Amplicones obtenidos de PCR KPC simple a partir de ADN total.

Cada número en la imagen representa los resultados de PCR obtenidos para cada aislamiento. Tal como se muestran en la imagen el amplicón esperado era de 890 pb, que puede observarse en los controles positivos correspondientes a los C+ en forma de una banda horizontal y no se observa dicha banda en el control negativo de las letras C-, se agregó un marcador de peso molecular de 890 pb como se observa en la letra M que se considera positivo al evidenciar la presencia de la banda de 890pb.

Tabla N°16 Resultados de amplicones obtenidos de PCR KPC simple a partir de ADN total.

N° de calle en el gel	Aislamiento	Resultado en la PCR
3	3	Positivo
4	4	Positivo
5	5	Positivo

Tabla N°16 (Continuación)

6	6	Positivo
7	7	Positivo
9	9	Positivo
10	10	Negativo
11	11	Positivo
13	13	Positivo
14	14	Positivo
15	15	Positivo
16	16	Positivo
17	17	Positivo
18	18	Positivo
19	19	Positivo
20	20	Positivo
21	21	Negativo
22	22	Positivo
24	24	Negativo
C+	Control positivo	Positivo: Presencia de banda de 890 pb
C-	Control Negativo	Negativo: Ausencia de banda de 890 pb
M	Marcador de peso molecular (890 pb)	Positivo: Presencia de banda de 890 pb

Nota aclaratoria: no se presentan la información de los resultados de los aislamientos 1, 2, 8, 12 y 23 ya que no corresponden a la especie *K pneumoniae* y no se consideraron parte del estudio puesto que no están contemplados dentro de los objetivos.

De acuerdo con los resultados fenotípicos se detectaron los genes codificantes de KPC (*bla_{KPC}*) en 18 de los 19 aislamientos estudiados equivalente al 94.7%

Los resultados mostraron que la mayoría de los aislamientos expresaron resistencia a los carbapenemes debido a la presencia del gen *bla_{KPC}* sin embargo es importante resaltar que en uno de los aislamientos no se detectó dicho gen pero sí se observó una resistencia a carbapenemes, esto puede estar relacionado a que la especie de *K. pneumoniae* posee una resistencia natural debido a la presencia de una β -lactamasa cromosómica^(27,59) que le permite a este patógeno tener un amplio espectro de resistencia.

Estos resultados abrieron paso a la evaluación de las relaciones de clonalidad, que no es más que la forma de visualizar si dichos aislamientos están vinculados genéticamente de manera idéntica entre sí, esto pudo realizarse entre los microorganismos productores de KPC mediante la macrorrestricción del genoma y electroforesis de campo pulsado.

5.3 Establecer posibles relaciones de clonalidad entre los microorganismos productores de KPC, mediante la utilización de enzimas de restricción del genoma en conjunto con electroforesis de campo pulsado (PFGE) y por medio de tipificación multilocus de secuencias (MLST).

Macrorrestricción del genoma de *K. pneumoniae* con XbaI seguido por electroforesis de campo pulsado (PFGE). ⁽⁴²⁾

Se realizó la macrorrestricción del genoma y electroforesis de campo pulsado (PFGE) en los aislamientos en estudio, el gel de agarosa con los resultados de la electroforesis puede verse en la figura N° 20.

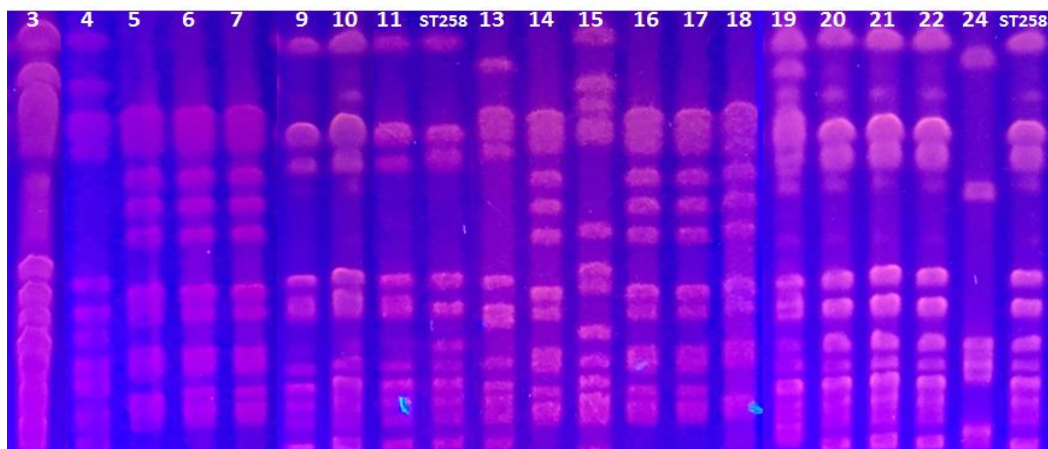
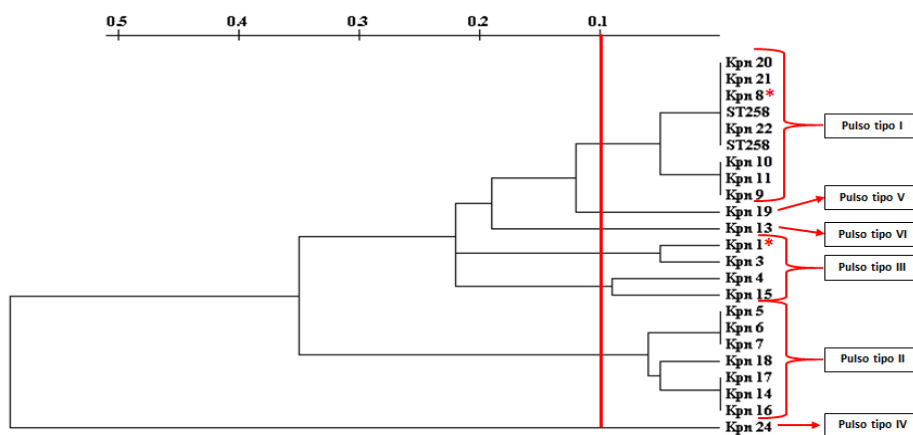


Figura N° 20 Electroforesis de campo pulsado de los 19 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*

Se compararon cada una de las 19 calles, correspondientes a los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, se realizó la elaboración de una matriz binaria, colocando el valor de cero (0) para la ausencia de una banda dentro de la calle o el valor de uno (1) para la presencia de una banda dentro de la calle; la matriz binaria generada fue digitada en el software TREECON₍₆₄₎ para poder establecer una relación clonal a partir de los patrones de bandas o pulso tipos obtenidos en el PFGE se construyó un dendrograma utilizando el algoritmo UPGMA. Que se observa en la Figura N° 21



*Nota aclaratoria: Los aislamientos 1 y 8 no son incluidos en los resultados de este estudio

Figura N° 21 Dendrograma de resultados PFGE de los 19 aislamientos *Klebsiella pneumoniae*

Se puede observar en el eje de las “X” el nivel de similitud y en el eje de las “Y” la asociación de los 19 aislamientos estudiados conforme a los pulsotipos obtenidos en el PFGE.

Se estableció la similitud que existe entre cada uno de los aislamientos tomando como referencia un nivel de similitud del 0.1 representado por la línea vertical roja dentro de la figura y de esta forma agruparlos entre sí, de tal modo que los aislamientos que se fusionan son aislamientos altamente clonales es decir genéticamente idénticos esto permitió tener una clara relación clonal y de esta forma agruparlos en 6 pulsotipos diferentes, con el propósito de seleccionar un representante por cada pulsotipo encontrado para realizar el estudio de MLST y posteriormente secuenciar.

Multilocus Sequence Typing (MLST)

De los 6 pulsotipos obtenidos dentro del dendrograma se seleccionó un aislamiento representante; ya que se consideran genéticamente idénticos si están dentro del mismo grupo, se realizó la secuenciación correspondiente de cada uno de los 6 representantes mencionados, esta se llevó a cabo por medio de MacroGen en Korea.

El perfil alélico establecido de cada uno determinó el secuenciotipo específico, haciendo uso de la base de datos del PUB med ERI para *K. pneumoniae*.

Los resultados del perfil alélico para los pulsotipos de este estudio pueden verse en la Tabla N° 17

Tabla N°17 Perfil alélico de los pulsotipos en estudio

Secuenciotipo encontrado	Sitios genéticos incluidos en el esquema de MLST para <i>Klebsiella pneumoniae</i>						
	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB
ST11	3	3	1	1	1	1	4
ST25	2	1	1	1	10	4	13
ST258	3	3	1	1	1	1	79
ST307	4	1	2	52	1	1	7

Para una mejor interpretación de los resultados se elaboró la tabla N° 18 donde se detalla la información de manera resumida que se obtuvo en las pruebas anteriores para establecer la relación clonal entre los organismos productores de KPC.

Tabla N°18 Resultados de relación clonal.

Pulsotipos	Secuenciotipos	Cantidad	Porcentaje	Aislamientos
Pulsotipo I	ST258	6	31.6	20, 21, 22, 10, 11, 9
Pulsotipo II	ST25	7	36.8	5, 6, 7, 18, 17, 14, 16
Pulsotipo III	ST11	3	15.8	3, 4, 15
Pulsotipo IV	ST307	1	5.3	24
Pulsotipo V	ST No Asignado	1	5.3	19
Pulsotipo VI	ST No Asignado	1	5.3	13
Total		19	100.0	

La tabla anterior describe los resultados de los secuenciotipos encontrados, entre ellos el ST258, causante del alta mortalidad debido a que presenta un amplio espectro de resistencia incluidos los carbapenemes siendo estos la última línea de tratamiento en casos de microorganismos resistentes, se esperaba una presencia marcada de este secuenciotipo en la mayoría de los aislamientos en estudio puesto que en ese momento se categorizó como un clon pandémico, sin embargo sólo representó un 31.6% de los aislamientos.

Teniendo como el ST más predominante en este estudio el ST25 equivalente a un 36.8% de los aislamientos, es conocido por sus características de hipermucoviscoso es decir más virulencia cuando se compara con las cepas de *K. pneumoniae* "clásico" ya que poseen la capacidad más eficiente de adquirir hierro y tal vez un aumento en la producción de cápsulas.

Para el caso del ST11 representó el 15.8% de los aislamientos, este ST se considera uno de los mayores diseminadores del bla KPC-2 y KPC-3 que es el que actualmente se encuentra posicionándose entre las β -lactamasas de mayor cantidad.

Y el ultimo ST identificado fue el ST307 equivalente a un 5.3% de los aislamientos, presenta una alta tasa de mortalidad por lo que es considerado uno de los clones de alto riesgo para pacientes, además se ha encontrado que es uno de los emergentes en diferentes lugares del mundo y podría convertirse en un nuevo clon pandémico.

5.4 Determinación de los elementos genéticos involucrados en la diseminación horizontal de resistencia, a través del estudio de la asociación a elementos genéticos móviles como transposones y la tipificación de los plásmidos portadores de *bla*_{KPC-2}.

Para la identificación de los elementos genéticos móviles se realizó el mapeo del entorno genético por medio de tres reacciones corriente arriba del gen *bla*_{KPC-2} (Up Stream) y una reacción corriente abajo del gen *bla*_{KPC-2} (Down Stream) mostrados en la metodología en la figura N° 15 "Esquema de reacciones para la caracterización del entorno genético de los *bla*_{KPC-2},"

Los resultados de las 4 reacciones se muestran en la figura N° 22.

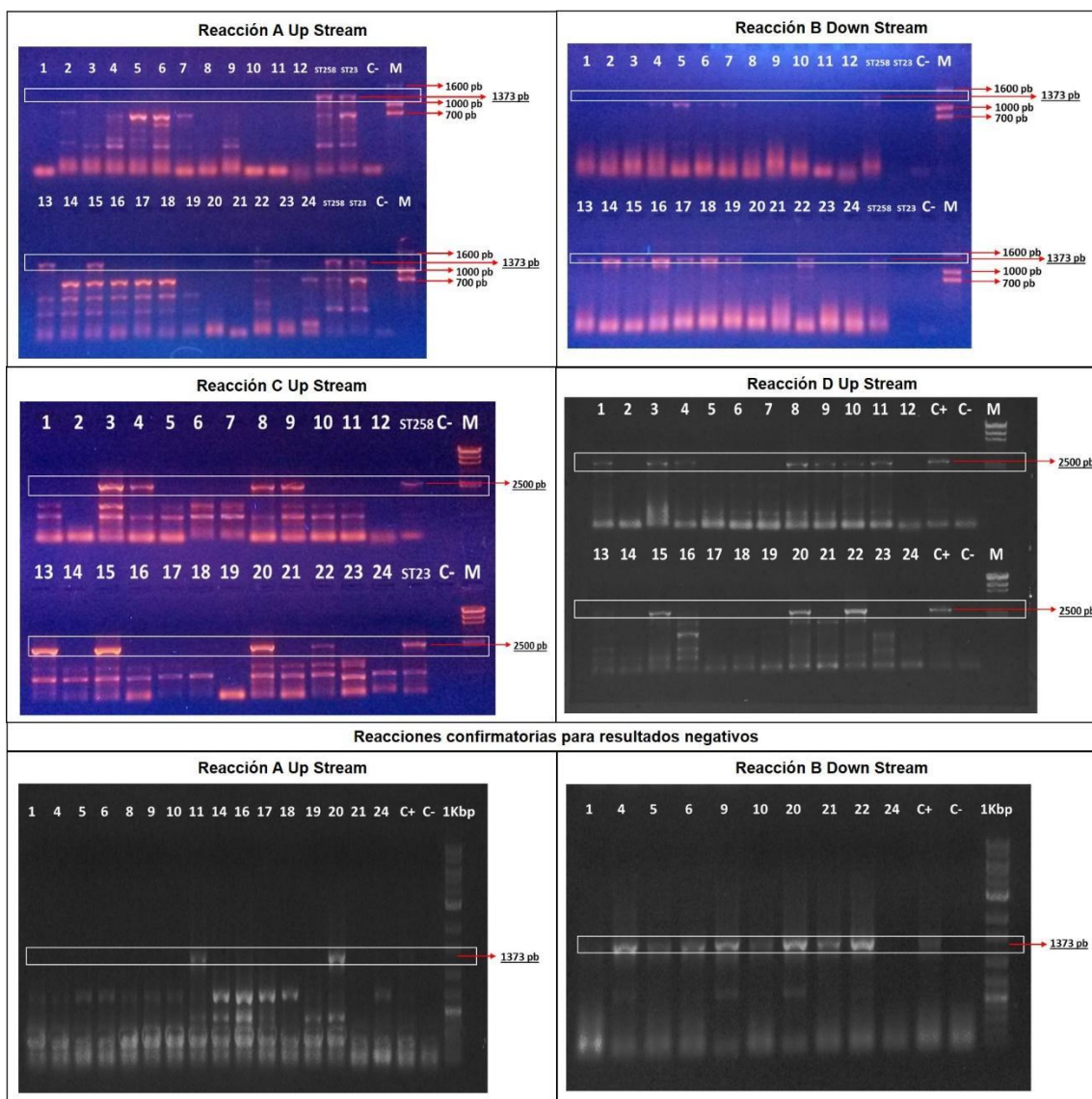


Figura N° 22 Geles de agarosa de las reacciones del entorno genético del gen *bla_{KPC-2}*

Las reacciones UP Stream permiten conocer el entorno del gen corriente arriba, en donde se conoce se encuentran ubicadas las transposasas (*tnpA*) y nuevas secuencias de inserción, *ISKpn6* e *ISKpn7* mientras que la reacción Down Stream permite conocer el entorno del gen corriente abajo en donde se conoce se encuentra ubicado un gen transposasa (*tnpA*)

En la figura N° 22 se observa las reacciones Up Stream A, C, y D, para la reacción A se evidenció como un resultado positivo la presencia de una banda de 1373 pb se reconfirmaron los resultados negativos en la reacción inicial, y con los datos finales se obtuvo un resultado positivo para un 31.6% de los aislamientos totales por lo que fue necesario hacer uso de la reacción D para complementar la información sobre el entorno, ya que esta toma una región un poco más grande pero incluye la región de la reacción A siendo su resultado positivo la presencia de una banda de 2500 pb o más, obteniendo 47.4% como resultados positivos de los aislamientos totales. Mientras que la reacción C se evidenció como un resultado positivo por la presencia de una banda de 2500 pb y se obtuvo para un 36.8% de los aislamientos totales.

Para la reacción Down Stream B se observó una reacción positiva por la presencia de la banda de 1373 pb, se reconfirmaron los resultados negativos en la reacción inicial, y con los datos finales se obtuvo un resultado positivo para un 94.7% de los aislamientos totales.

Con la información generada por la figura anterior se elaboró la siguiente tabla de resultados

Tabla N°19 Resultados del entorno genético del gen *bla_{KPC-2}*

N° de calle en el gel	Aislamiento	Secuenciotipo	Reacción A (Up Stream)	Reacción B (Down stream)	Reacción C (Up stream)	Reacción D (Up stream)
3	3	ST11	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
4	4	ST11	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
5	5	ST25	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
6	6	ST25	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
7	7	ST25	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
9	9	ST258	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
10	10	ST258	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
11	11	ST258	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo

Tabla N°19 (Continuación)

13	13	No asignado	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
14	14	ST25	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
15	15	ST11	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
16	16	ST25	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
17	17	ST25	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
18	18	ST25	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
19	19	No asignado	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
20	20	ST258	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
21	21	ST258	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
22	22	ST258	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
24	24	ST307	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
1	1	ST11	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
2	2	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
8	8	ST258	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
12	12	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23	23	-	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
ST258	Control positivo Secuenciotipo 258	-	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
ST23	Control positivo Secuenciotipo 23	-	Positivo	Positivo	Positivo	N/A
C-	Control negativo	-	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M	Marcador de peso molecular	-	Marcador de peso molecular (3 Bandas: 700,100 y 1600 pb) y 1 Kb Positivo	Marcador de peso molecular (3 Bandas: 700,100 y 1600 pb) y 1 Kb Positivo	Marcador de peso molecular λ hind III	Marcador de peso molecular λ hind III

- Nota aclaratoria:** Los resultados de los aislamientos 1, 2, 8, 12 y 23 No son considerados para este estudio.
- Pruebas positivas en los aislamientos en estudio.
- Aislamientos que presentaron entorno genético completo del gen *bla_{KPC}*.

Por la información brindada de los secuenciotipos encontrados mediante MLST, se esperaba una respuesta positiva para el entorno genético completo del gen *bla_{KPC-2}* para los 6 aislamientos que pertenecen al ST258, sin embargo, solo 3 de los aislamientos de este secuenciotipo mostraron este entorno genético completo. Puede deberse principalmente a que estos aislamientos sean parte del clado I que está relacionado con el KPC-2, si bien los restantes pertenecen al mismo secuenciotipo pueden estar incluidos en el clado II y estar asociados al KPC-3.

El entorno genético correspondiente al gen *bla_{KPC-2}* encontrado en los aislamientos fue el transposón 4401 (Tn4401) completo según la figura N°10, es decir que presentaron resultados positivos en las reacciones B, C y D del entorno genético.

En el estudio se confirmó que el 36.8% de los aislamientos totales poseen un entorno genético completo del gen *bla_{KPC-2}*, de los cuales el 15.8% pertenecen al ST258

El Tn4401 se identificó como la plataforma genética para *bla_{KPC(28)}* en linajes epidémicos como ST258. Actualmente, se han descrito nuevas plataformas genéticas donde se encuentra el gen *bla_{KPC}*, las cuales se diferencian de Tn4401 debido a otras deleciones e inserciones de otros genes y a la adición de otras secuencias de inserción.

En las nuevas plataformas descritas, los principales cambios ocurren en la región río arriba del gen *bla_{KPC}*, lo que sugiere que esta región es variable lo que se observó en este estudio mediante la reacción C donde los aislamientos 10 y 11 con ST258 fueron diferentes en el entorno.

Sin embargo, en ST25 y ST11, generalmente no están relacionados con *bla_{KPC}*, a pesar de no estar asociados se obtuvieron resultados para los aislamientos 4 y 15 pertenecientes al ST11 que indican que existe una relación genética como se interpreta en el dendograma, al igual para el aislamiento 13 que no posee un secuenciotipo asignado, y puede ser debido a las variantes isoformas que se presentan en el Tn4401₍₇₀₎. Para los demás aislamientos no se detectaron los entornos mapeados y estudios futuros son necesarios para caracterizar el contexto genético de *bla_{KPC}* en dichos aislamientos.

Tipificación de los plásmidos portadores de *bla_{KPC}* determinación de grupos de incompatibilidad⁽⁶⁹⁾

Se realizó la tipificación de los plásmidos portadores de *bla_{KPC}* por la determinación de grupos de incompatibilidad en los aislamientos en estudio, mediante PCR de tipo multiplex sus geles de agarosa pueden verse en la tabla N° 20 y PCR de tipo simplex los geles de agarosa pueden verse en la tabla N° 21.

PCR Multiplex

Tabla N°20 Multiplex PCR de ADN total para la determinación de grupos de incompatibilidad de plásmidos

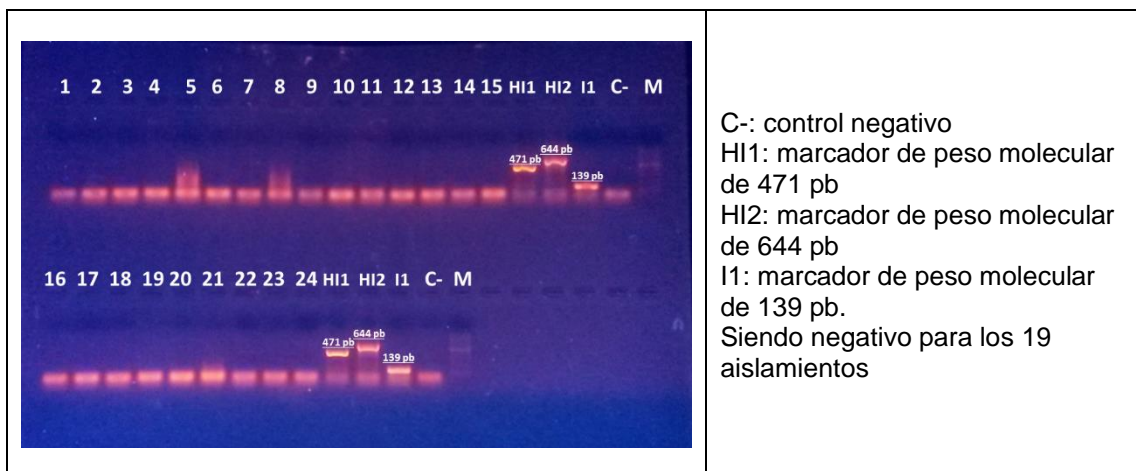
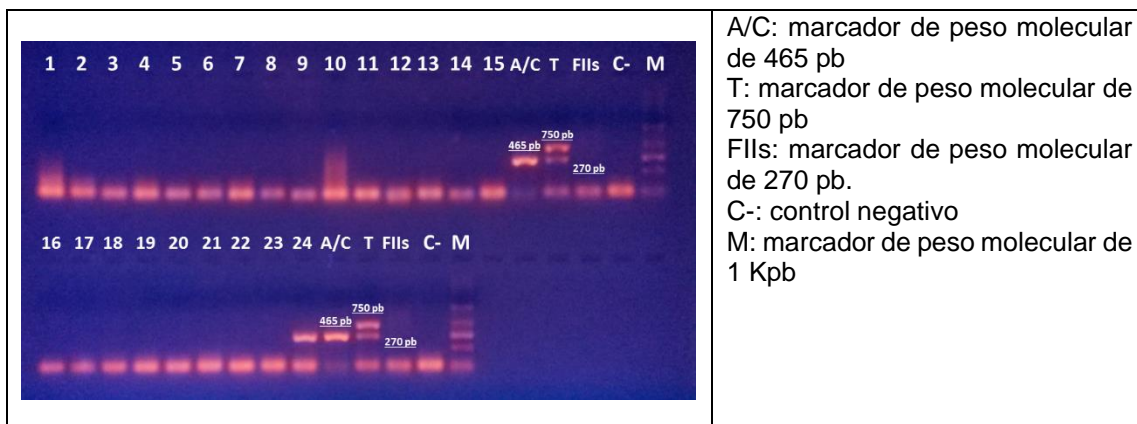


Tabla N°20 (Continuación)

	<p>C-: control negativo X: marcador de peso molecular de 376 pb N: marcador de peso molecular de 559 pb L/M: marcador de peso molecular de 785 pb.</p>
	<p>C-: control negativo FIA: marcador de peso molecular de 462 pb FIB: marcador de peso molecular de 702 pb W: marcador de peso molecular de 242 pb.</p>
	<p>Se agregaron P1 y P2 son plásmidos extraídos de la Mx 1 y 2 C-: control negativo Y: marcador de peso molecular de 765 pb P: marcador de peso molecular de 534 pb FIC: marcador de peso molecular de 262 pb. M: marcador de peso de 1 Kpb</p>

Tabla N°20 (Continuación)

**Notas aclaratorias:**

- Se puede observar en las calles el número de aislamiento correspondiente del 1 al 24.
- Los resultados de los aislamientos 1, 2, 8, 12 y 23 no fueron considerados dentro del estudio.
- Los resultados generales pueden verse al final en la tabla N° 22

En la mayoría de los aislamientos analizados se pudo observar que los resultados fueron negativos, para el caso de las Multiplex Inc 1, 4 y 5, sin embargo, se obtuvieron resultados positivos los cuales se detallan de mejor manera en la tabla N°22, ya que nos permite ver el panorama general de los resultados y así determinar si el aislamiento en estudio posee alguno de estos grupos dentro del plásmido.

PCR Simples

Tabla N°21 PCR Simples de ADN total para la determinación de grupos de incompatibilidad de plásmidos

<p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 C+ C- M</p> <p>13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 C+ C- M</p> <p>270 pb 262 pb</p>	<p>El amplicon esperado de 270 pb. C+: control positivo C-: control negativo M: marcador de peso molecular de 262 pb.</p>
<p>1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 C+ C- M</p> <p>13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 C+ C- M</p> <p>159 pb 139 pb</p>	<p>El amplicon esperado de 159 pb. C+: control positivo C-: control negativo M: marcador de peso molecular de 139 pb.</p>
<p>1 3 5 6 7 8 9 10 11 13 14 15 C+ C- M</p> <p>16 18 19 20 22 24 C+ C- M</p> <p>160 pb</p>	<p>El Amplicon esperado es de 160 pb C+: control positivo C-: control negativo M: marcador de peso molecular de de 1 Kpb</p>

Notas aclaratorias:

- Se puede observar en las calles el número de aislamiento correspondiente del 1 al 24.
- Los resultados de los aislamientos 1, 2, 8, 12 y 23 no fueron considerados dentro del estudio.
- Los resultados generales pueden verse al final en la tabla N° 22

Tabla N° 22 Resultados de tipificación de los plásmidos portadores de *bla_{KPC}*
determinación de grupos de incompatibilidad

AISLAMIENTO	GRUPOS DE INCOMPATIBILIDAD															Resultados Grupo de Incompatibilidad			
	MULTINC #1			MULTINC #2			MULTINC #3			MULTINC #4		MULTINC #5		SIMPLE INC					
	HI1 (471 Pb)	HI2 (644 Pb)	I1 (139 Pb)	X (376 Pb)	L/M (785 Pb)	N (559 Pb)	FIA (462Pb)	FIB (702 Pb)	W (242 Pb)	Y (765 Pb)	P (534 Pb)	FIC (262 Pb)	A/C (465 Pb)	T (750 Pb)	FIIs (270 Pb)		PCR repB (270pb)	PCR B/O (159pb)	PCR K (160Pb)
3																			NT
4							+												FIA
5					+														L/M
6					+		+												L/M, FIA
7					+		+												L/M, FIA
9																			NT
10																			NT
11							+												FIA
13						+													N
14							+												FIA
15							+												FIA
16					+														L/M
17					+														L/M
18					+														L/M
19					+														L/M
20																			NT
21																			NT
22																			NT
24							+					+							FIA, A/C

Nota aclaratoria: Solo se observan los resultados positivos (+) en la tabla de resultados de tipificación de los plásmidos.

- Representan los aislamientos en estudio que no pudieron ser tipificados con algún grupo de incompatibilidad.

El *Tn4401* ha sido detectado en aislamientos de diferentes orígenes geográficos, y en distintos ST, además de variadas especies de enterobacterias e incluso en *P. aeruginosa*. Una característica de gran importancia es que este transposón posee la capacidad de insertarse en diferentes plásmidos de bacterias gramnegativas y ha sido identificado tanto en plásmidos conjugativos y no conjugativos movilizables.

Los plásmidos pueden ser diferenciados de acuerdo a grupos de incompatibilidad, Es posible que plásmidos de diferentes tipos de incompatibilidad puedan coexistir en una célula, normalmente plásmidos relacionados son incompatibles, en el sentido de que solo uno de ellos sobrevive en la línea celular, debido a la regulación de las funciones vitales de los plásmidos.

Se observó que de los aislamientos en estudio el 26.3% se tipificó como plásmidos pertenecientes al grupo L/M, un 5.3% perteneciente al grupo N y el 21.1% se tipificaron como plásmidos pertenecientes al grupo FIA.

Se esperaba observar la presencia de un grupo de incompatibilidad IncF con el replicón FIA como predominante⁽⁶⁶⁾ para los aislamientos en estudio pertenecientes al ST258, sin embargo, se observó que un 16.7% de estos poseen el replicón FIA, el resto no fue tipificable, lo que puede deberse a que esté presente un plásmido relacionado y estudios más profundos deberían ser aplicados.

También se detectó más de un grupo de incompatibilidad en un mismo aislamiento como se muestra en la tabla N°22 sugiriendo la presencia de más de un plásmido en los aislamientos 6, 7 y 24, lo que representa un 15.8% de los aislamientos totales.

En aquellos aislamientos donde se presenta más de un grupo de incompatibilidad no se puede atribuir cual de dichos plásmidos es el portador de *bla_{KPC-2}*. Para poder confirmar que plásmido es portador de *bla_{KPC}* en los aislamientos que son multirreplicón se deberían obtener células de *Escherichia coli* transformantes (TF) con el plásmido portador de *bla_{KPC-2}* y luego caracterizar dicho TF por la técnica Caratolli.

5.5 Entrevista realizada en las unidades relacionados con la verificación de la resistencia bacteriana en centros de salud o investigación en el departamento de San Salvador

Entrevista diagnostico

Se entrevistaron encargados o jefes de los departamentos de bacteriología, laboratorio clínico o los relacionados con el tema de la verificación de resistencia bacteriana de los siguientes centros:

- Hospital Nacional General “Dr. Juan José Fernández” Zacamil
- Hospital Nacional de La Mujer "Dra. María Isabel Rodríguez".
- Hospital General del Instituto del Seguro Social.
- Laboratorio Nacional de Referencia “Dr. Max Bloch”

Los resultados de la entrevista se detallan a continuación

1. ¿Qué métodos o técnicas se utilizan en la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en los aislamientos bacterianos en El Salvador en forma general?

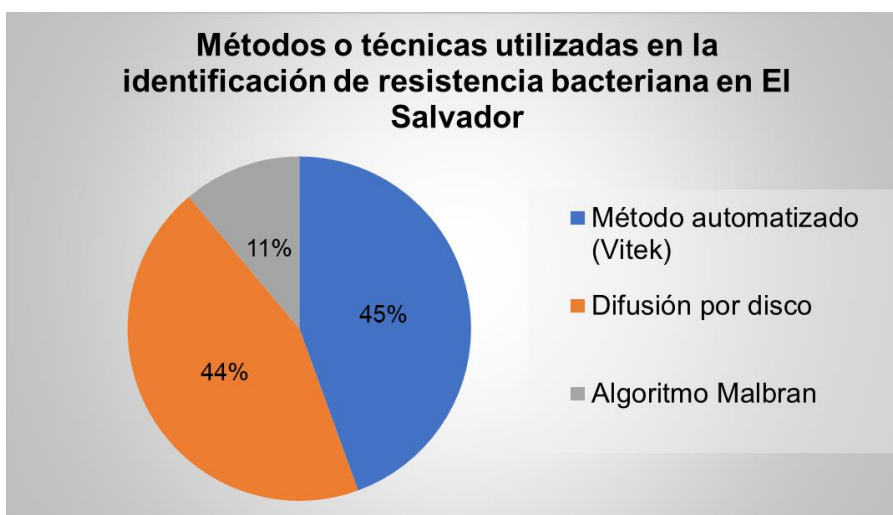


Figura N° 23 Métodos o técnicas utilizadas en la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en los aislamientos bacterianos en El Salvador

Se observa un uso mayoritario de un 45% del método automatizado Vitek, seguido del 44% del método por difusión en disco y el 11% para el algoritmo malbran, para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana por parte de los centros de salud e investigación, lo que hace inferir que el método automatizado es uno de los más utilizados actualmente y que presenta mejores resultados por su rapidez y eficiencia, además de permitir que se puedan evaluar diferentes aislamientos resistentes para posteriores estudios de tipificación por biología molecular.⁽³⁹⁾

2. ¿Qué método o técnica utiliza este centro de salud/investigación para la identificación de resistencia bacteriana?

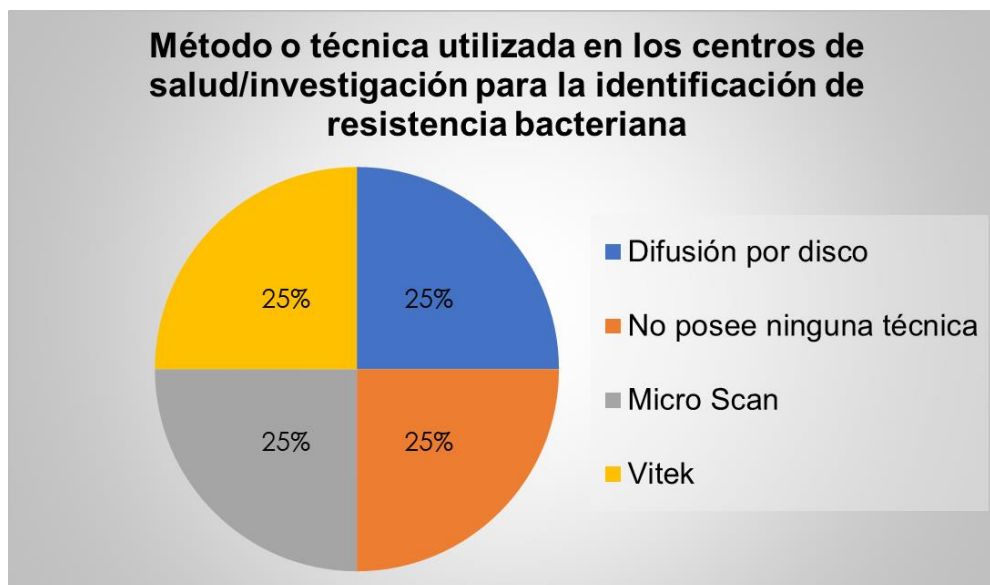


Figura N° 24 Método o técnica utilizada en los centros de salud/investigación para la identificación de resistencia bacteriana

Se observó que 3 de los 4 centros entrevistados realiza una técnica o método específico de acuerdo con los recursos con los que se contaban, sin embargo 1 de los 4 manifestó no poseer una técnica de identificación de resistencia bacteriana.

En base a esa información se pudo detectar que ninguna de las técnicas utilizadas es de biología molecular, por lo que se ve limitada la información que se obtiene sobre los aislamientos que se clasifican como resistentes a partir de las pruebas de “determinación de sensibilidad” por los métodos que cada centro posee, limitando a su vez un tratamiento adecuado para los pacientes de donde se aíslan estos patógenos multirresistentes.

3. ¿Al obtener los datos sobre resistencia bacteriana que se hace con estos datos?

En la figura N°25 se observa cual es el proceso a seguir cuando se obtienen datos de resistencia bacteriana en el país siendo su etapa inicial el registro y la final un informe a la OPS; sin embargo, se detectó que solo 1 de los 4 centros entrevistados realiza este proceso en cada una de sus etapas, siendo el laboratorio nacional el único cumplidor de este proceso.

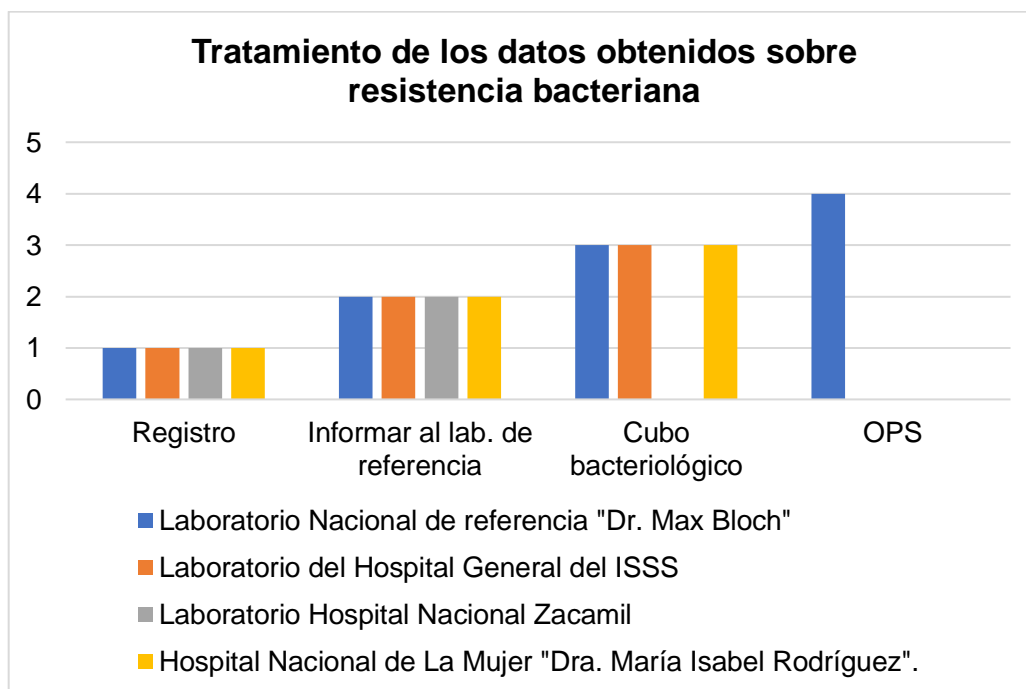


Figura N° 25 Tratamiento de los datos obtenidos sobre resistencia bacteriana

El tratamiento de los datos obtenidos sobre resistencia bacteriana requiere que estos sean enviados a la OPS, siendo los laboratorios encargados de realizar el procesamiento de esta información de enviarlo al laboratorio de Nacional de referencia y este debe realizar el respectivo reporte para que esta información se mantenga actualizada.

4. ¿Qué se hace con los aislamientos que se identifican como resistentes?

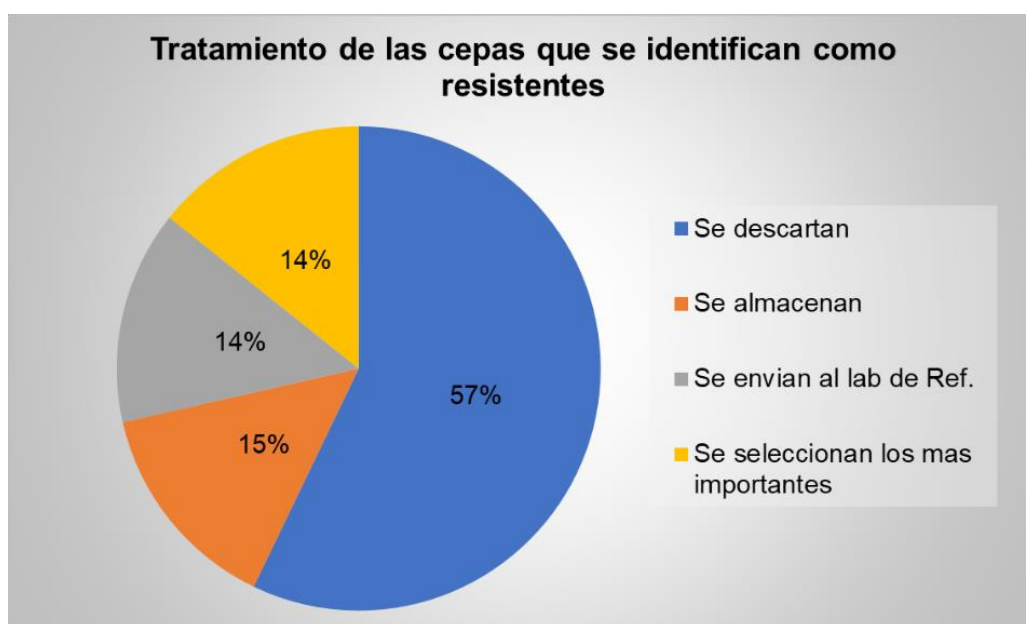


Figura N° 26 Tratamiento de las cepas que se identifican como resistentes

La figura N°26 nos muestra que es lo que sucede con los aislamientos después de identificarlos resistentes, en un 57% estos se descartan y solo un 15% manifestó almacenarlos, lo que indica que muchos aislamientos que podrían utilizarse en estudios posteriores de tipificación están siendo desechados y dejando una brecha en la línea de tiempo en cuanto a la investigación de un gen en específico y sobre todo en la región Centroamérica que no existe más información sobre el tema.

5. ¿Cree que es necesario mejorar los métodos o técnicas para la identificación de resistencia bacteriana?

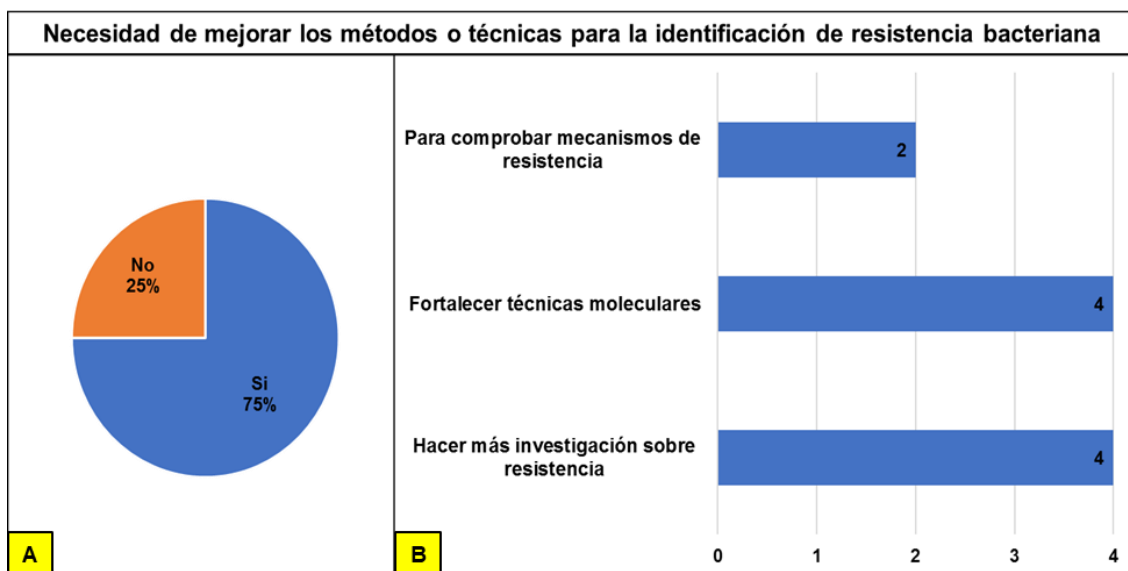


Figura N° 27 Necesidad de mejorar los métodos o técnicas para la identificación de resistencia bacteriana

En la figura N°27 A. se observó que de los entrevistados el 75% considera necesario mejorar los métodos o técnicas para la resistencia bacteriana.

En la Figura N°27 B. se observó que la razón por la que se considera importante mejorar es para fortalecer técnicas moleculares lo que en consecuencia permite hacer más investigación sobre resistencia, que fue la segunda razón más mencionada.

6. ¿Tiene algún conocimiento sobre los métodos y técnicas de biología molecular en la identificación de los mecanismos de resistencia bacteriana?

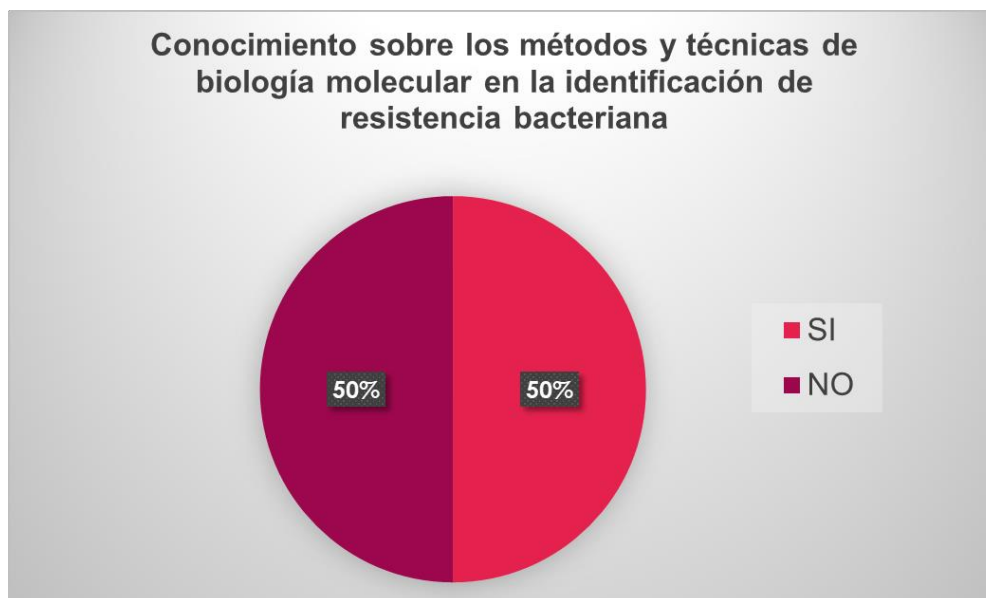


Figura N° 28 Conocimiento sobre los métodos y técnicas de biología molecular en la identificación de resistencia bacteriana

En los resultados que se obtuvieron de los centros de salud/investigación participantes el 90% posee los conocimientos teóricos sobre métodos o técnicas de identificación de bacterias resistentes, tanto desde el enfoque fenotípico como genotípico, sin embargo no todos pueden poner en práctica las técnicas o metodologías debido a la falta de recursos, además manifestaron realizar mejoras en la capacitación sobre el tema para poder mejorar el proceso de verificación de resistencia bacteriana para diversos patógenos.

5.6 Publicaciones científicas y presentaciones en congresos

Cabe mencionar que los resultados obtenidos del presente trabajo de investigación sirvieron para presentarse en congresos internacionales y actualmente forman parte de un artículo en la revista científica “Journal of Global Antimicrobial Resistance”.

5.6.1 Publicación:

Changing epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Argentina: Emergence of hypermucoviscous ST25 and high-risk clone ST307. Cejas, D., Elena, A., Guevara Nunez, D., Sevillano Platero, P., De Paulis, A., Magarinos, F., Radice, M. (2019). *J Glob Antimicrob Resist*, 18, 238-242. doi:10.1016/j.jgar.2019.06.005

5.6.2 Congresos:

The changing epidemiology of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* clones glimpse a worse scenario imposed by this hyper epidemic pathogen. Cejas D, Guevara Nuñez D, Sevillano Platero P, Fernández Canigia L, De Paulis A, Elena A, Gutkind G, Radice M. Presentado en IV International Congress in Translational Medicine, 2018. Buenos aires, Argentina. BEST POSTER PRIZE.

The Changing Epidemiology of KPC Producing *Klebsiella pneumoniae*: Emergence of Hypermucoviscous ST25 and Epidemic Clone ST307. Cejas D, Guevara Nuñez D, Sevillano Platero P, Fernández Canigia L, De Paulis A, Elena A, Gutkind G, Radice M. Presentado en Microbe 2018 (ASM), Atlanta (USA).

Estudio epidemiológico de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC-2 en un Hospital Universitario. Guevara Nuñez D, Cejas D, Bertona E, Radice M, De Paulis A. Presentado en SADEBAC 2018, Buenos Aires, Argentina.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. La producción de la β -lactamasas de tipo KPC se pudo detectar fenotípicamente en los 19 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* procedentes de infecciones nosocomiales o de cultivos de vigilancia durante el periodo de noviembre de 2016 a febrero de 2017 en el Hospital Alemán de la Ciudad de Buenos Aires, Argentina.
2. Los aislamientos productores de KPC no correspondieron a un único tipo clonal. El ST258 no pertenece con la única línea clonal productora de KPC-2 circulando en el hospital como sucedía anteriormente.
3. Se detectaron nuevos secuenciotipos (ST) más virulentos como el ST25 y ST11; y clones de alto riesgo como ST307.
4. El Tn4401 fue el elemento genético involucrado en la diseminación horizontal de *bla*_{KPC-2} en los clones epidémicos pertenecientes al ST258.
5. En los plásmidos portadores de *bla*_{KPC}, no pudo detectarse un único replicón (grupo de incompatibilidad) involucrado en la diseminación de *bla*_{KPC-2}, y otros ensayos serían necesarios.
6. Se identificó que los centros de salud/investigación evaluados del departamento de San Salvador no realizan todas las técnicas o metodologías en la detección fenotípica de mecanismos de resistencia, debido a la falta de recursos además de tener la necesidad de realizar mejoras en la capacitación sobre el tema para optimizar los procesos de verificación de resistencia bacteriana para diversos patógenos.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Diseñar mapeos del entorno genético para diferentes variantes de KPC, principalmente para KPC-3 que podría estar presente en los aislamientos de este estudio para posteriores investigaciones.
2. Obtener células de *Escherichia coli* transformantes (TF) con el plásmido portador de *bla_{KPC-2}* para poder confirmar que plásmido es portador de *bla_{KPC}* en los aislamientos que son multirreplícón en estudios posteriores.
3. Mejorar el proceso de verificación de resistencia bacteriana para diversos patógenos en El Salvador por parte del Laboratorio Nacional de referencia “Dr. Max Bloch”
4. Implementar las técnicas de detección de bacterias resistentes por los laboratorios encargados del monitoreo de la resistencia bacteriana del país para una adecuada administración de antibióticos en los hospitales.
5. Trabajar en conjunto los laboratorios encargados del monitoreo de la resistencia bacteriana en el país con la región Centroamericana para establecer una epidemiología regional y las prevalencias de los secuenciotipos presentes.
6. Establecer propuestas de los laboratorios encargados del monitoreo de la resistencia bacteriana en el país en base a los mecanismos de resistencia encontrados con la industria farmacéutica para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos o combinaciones más efectivas.

7. Establecer programas por parte de la red de hospitales del país que permitan un mayor control de la administración de antibióticos y disminuir la automedicación por parte de la población.

BIBLIOGRAFIA

1. Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. Philosophical transactions of the royal Society of London. B, Biological Sciences, 289(1036), 321-331. doi:10.1098/rstb.1980.0049
2. American Society for, M., Bergey, D. H., & Breed, R. S. (1957). Bergey's manual of determinative bacteriology (7th ed. ed.). Baltimore: Williams & Wilkins Co.
3. Biología, L. G. (2015) Tipos de flagelo según su localización en bacterias. [En línea] Disponible en: <https://biologia.laguia2000.com/microbiologia/el-flagelo-en-bacterias>
4. BioMérieux (2018) Brochure de sistema vitek. BIOMÉRIEUX. PRN 17-0328-00 [En línea] disponible en: https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/18-vitek2-systembrochure_v2.pdf
5. Bioq. Guevara Nuñez. (2018) Estudio epidemiológico de aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC. Tesis de Posgrado en ciencias médicas. Pontificia Universidad Católica Argentina. Argentina.
6. Biotecnología de la vida. Concepto de plásmido bacteriano (2014) [En línea] Disponible en: <https://biotecnologiadelavida.wordpress.com/6-quins-son-els-principals-vectors-de-clonacio/>
7. Blog. Biología celular, Glosario de términos. (2014) [En línea] Disponible en: <http://celumaravilla.blogspot.com/2014/08/glosario-de-terminos.html>

8. Bradford, P. A., Bratu, S., Urban, C., Visalli, M., Mariano, N., Landman, D., Quale, J. (2004). Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis*, 39(1), 55-60. doi:10.1086/421495
9. Breurec S, Guessennd N, Timinouni M. (2013) et al. *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: Multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. *Clin Microbiol Infect*. 19(4):349-355. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03805.x
10. Brody, J.R., Kern, S.E. (2004) History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *Anal Biochem*. 333 (1):1-13. doi:10.1016/j.ab.2004.05.054 PMID 15351274 PDF
11. Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09
12. Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). *Identification of plasmids by PCR-based replicon typing*. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), 219–228. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018
13. Carroll S, Doebley J, Griffiths A, Wessler S. (2000) *Introduction to Genetic Analysis*, tenth edition, New York: W.H.Freeman and Company. Pages 284 a 287

14. Cejas D. (2017). Resistencia a antibióticos de relevancia clínica en bacilos gram-negativos. Ponencia de cátedra de biología molecular. Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires. Argentina.
15. Cejas, D. (2014). Prevalencia, Caracterización del Entorno Genético y Evolución in vitro de Genes de ampC de localización plasmídica, en Enterobacteriaceae. (Tesis de Doctorado), Universidad de Buenos Aires, Argentina, Buenos Aires, Argentina.
16. Cejas, D., Canigia, L. F., Nastro, M., Rodríguez, C., Tanco, A., Rodríguez, H., Giovanakis, M. (2012). Hyperendemic clone of KPC producing *Klebsiella pneumoniae* ST 258 in Buenos Aires hospitals. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(3), 499-501.
17. CLSI. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (ISSN 2162-2914 (Electronic)). [En línea]. Disponible en: <http://iaclid.org/DL/public/CLSI-2018-M100-S28.pdf>
18. Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A., & Brisse, S. (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*, 43(8), 4178-4182. doi:10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005
19. Escuelapedia. Identificación de bacterias gran negativas y gran positivas. [En línea]. Disponible en: <http://www.escuelapedia.com/identificacion-de-bacterias-gram-positivas-y-gran-negativas/>
20. España, B. U. Elementos transponibles. (2015) [En línea]. Disponible en: http://bioinformatica.uab.es/base/documents%5CmasterGP%5CElementos%20transponibles_ver2.pdf

21. García, S., Fresnadillo, M., & García, S. (1998). Antibióticos betalactámicos: concepto y clasificación. *Medicina*, 7(88), 4108-4115.
22. Glosarios. Glosario Genética. (2014) [En línea]. Disponible en: <https://glosarios.servidor-alicante.com/genetica/clon>
23. Grupo KES. Marcelo Galas y Red WHONET-Argentina. Servicio Antimicrobianos. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" Buenos Aires, Argentina. (2013) [En línea] Disponible en: <http://www.antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2013/02/Grupo-KES-boletin-13.pdf>
24. 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.
25. Herrera, M.L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34 (Suppl.). 33-41. [En línea] Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-5461999000100010&lng=en&tlng=es.
26. Herrera, S., G., R., & Quiteño de Majano, C. (2017). " Detección in vitro de betalactamasas de espectro extendido en aislados clínicos de *Escherichia coli* provenientes del Hospital Nacional Zacamil. *CREA CIENCIA* Vol. 10 No 2 ISSN1818-202X JULIO-DICIEMBRE 2016 Universidad Evangélica de El Salvador.

27. Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. A., Participating National Healthcare Safety Network, F. (2008). NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 29(11), 996-1011. doi:10.1086/591861
28. Horacio A. Lopardo, S. C. P., Carlos Vay. (2017). Manual de microbiología clínica de la asociación Argentina de Microbiología. Manual [Parte IIc. 1 *Enterobacterias*]. (VOLUMEN I: Bacterias de Importancia Clínica). Argentina, Buenos Aires.
29. Janssen-Cilag, O. (2015) [En línea] Disponible en:<https://es.sott.net/article/56295-Una-nueva-investigacion-descubre-que-el-glifosato-entre-otros-herbicidas-provoca-resistencia-a-los-antibioticos>
30. Juan Ángel Basualdo, C. E. C., Ramón Alberto de Torres. (2006). *Microbiología Biomédica* (2a Ed. ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Atlante s.r.l.
31. Juan J. Picazo (2000) *Procedimientos en Microbiología Clínica*. [En línea] Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
32. Julian Pampel (2017) Concepto Housekeeping. Genomics. [En línea]. Disponible en: <https://www.genomics-online.com/resources/16/5049/housekeeping-genes/>

33. Kado, C. I., & Liu, S. T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of Bacteriology*, 145(3), 1365-1373.
34. Larson, E. L., Cimiotti, J. P., Haas, J., Nesin, M., Allen, A., Della-Latta, P., & Saiman, L. (2005). Gram-negative bacilli associated with catheter-associated and non-catheter-associated bloodstream infections and hand carriage by healthcare workers in neonatal intensive care units. *Pediatr Crit Care Med*, 6(4), 457-461. doi:10.1097/01.PCC.0000163669.37340.91
35. Laura Espinosa Asuar (2013) Capítulo 17 Guía práctica sobre la técnica de PCR. México. Universidad Nacional Autónoma de México. [En línea] Disponible en: <https://es.scribd.com/document/15417312/Guia-Practica-Sobre-La-Tecnica-PCR>
36. Libre, E. Tipificación multilocus de secuencias (MLST). (2014= En línea de:https://es.wikipedia.org/wiki/Tipificaci%C3%B3n_multilocus_de_secuencias
37. Liliana Jordá Vargas y col. (2005) Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Acta bioquímica clínica Latino Americana*. 39(1) pág. 19-25
38. López Vargas, J. A., & Echeverri Toro, L. M. (2010). *K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Iatreia*, 23, 157-165.
39. Luis Felipe Moncada (2015) *Klebsiella pneumoniae* productora de Carbapenemasa KPC. Tesis de Licenciatura en Bioanálisis Clínico. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua Instituto Politécnico de la Salud. Nicaragua.

40. Marín, M., & Gudiol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 21(1), 42-55.
41. Martínez, Dianny, Araque, Yasmina, Roduifo, Hectorina, Caña, Luisa, García, José, Gonzáiez, Diorelis, Rodríguez, Lucy, & De Donato, Marcos. (2016). Relación clonal y detección del gen blaKPC en cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, en un hospital de Venezuela. *Revista chilena de infectología*, 33(5), 519-523. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v33n5/art06.pdf>
42. 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. *Journal of clinical microbiology*, 34(12), 3138-3141.
43. Naas, T., Cuzon, G., Villegas, M.-V., Lartigue, M.-F., Quinn, J. P., & Nordmann, P. (2008). Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1257-1263.
44. Navarra, Diccionario médico. (2014) [En línea] Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/sideroforo>
45. NCBI, Pathogen/betalactamases/Allele. (2015) [En línea] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/>
46. NHGRI, Glossary of Genetics Terms. (2015) [En línea] Disponible en: <https://www.genome.gov/glossarys/index.cfm?textonly=true&search=>

47. NIH, Definición genoma. (2016) [En línea] Disponible en: <https://www.cancer.gov/español/publicaciones/diccionario/def/genoma>
48. Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases*, 9(4), 228-236.
49. OMS, (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Ginebra. [Base de datos en línea]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>.
50. OMS, Resistencia a los antimicrobianos. (2017). [Base de datos en línea]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
51. Oxford. Clonal definición. (2016) [En línea]. Disponible en: <https://es.oxforddictionaries.com/definicion/clonal>
52. Patricia García C. (2002) Ventajas y problemas de los métodos automatizados de estudio de susceptibilidad in vitro. *Rev Chil Infect.* 19 (Supl.2). [Base de datos en línea]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v19s2/art06.pdf>
53. Salud, Biblioteca virtual en Salud. (2015) [En línea]. Disponible en: http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/?IsisScript=../cgibin/decserver/decserver.xis&task=exact_term&previous_page=homepage&interface_language=e&search_language=e&search_exp=Endemia

54. Salud, (2014). Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos y de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud - 2014. REVISTA DE PATOLOGIA TROPICAL / Instituto de patología Tropical –
55. Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, volume 3, apendices B.11 and B.23 ISBN 0-87969-309-6
56. Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. En: Temas de Bacteriología y Virología Médica, 631-647.
57. Servicio antimicrobianos. Algoritmos. (2020). Dpto. Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) - ANLIS “DR. Carlos G. Malbran”. [En línea]. Disponible en <http://antimicrobianos.com.ar/category/algoritmo/>
58. Shetty, N., Hill, G., & Ridgway, G. L. (1998). The Vitek analyser for routine bacterial identification and susceptibility testing: protocols, problems, and pitfalls. *Journal of Clinical Pathology*, 51(4), 316–323. doi:10.1136/jcp.51.4.316 <https://scihub.to/10.1136/jcp.51.4.316>
59. Sievert, D. M., Ricks, P., Edwards, J. R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., Participating, N. F. (2013). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the centers for disease control and prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 34(1), 1-14. doi:10.1086/668770

60. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (2005). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cap 18. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. [En línea] Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>
61. Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(2), 116-129.
62. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V. (1995) Interpreting Chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. 33(9):2233-2239. doi:0095-1137/
63. UNAM (2012) Identificación microbiana mediante el sistema VITEK 2 de BIOMÉRIEUX. [En línea]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/IdentificacionConVITEK2_21548
64. Van de Peer, Y., De Wachter, R. (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10, 569-570.
65. Vázquez JA, Berrón S. (2004) Multilocus sequence typing: El marcador molecular de la era de Internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 22(2):113-120. doi:10.1157/13056892

66. Vera-Leiva, Alejandra, Barría-Loaiza, Carla, Carrasco-Anabalón, Sergio, Lima, Celia, Aguayo-Reyes, Alejandro, Domínguez, Mariana, Bello-Toledo, Helia, & González-Rocha, Gerardo. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 476-484. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>
67. Wang, L.-H., Wei, D.-D., Wan, L.-G., Yu, Y., Deng, Q., & Liu, Y. (2016). Diversity of the Genetic Environment of the *bla_{KPC-2}* Gene Among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in a Chinese Hospital. *Microbial Drug Resistance*, 22(1), 15–21. doi:10.1089/mdr.2014.0281
68. Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., Sievert, D. M. (2016). Antimicrobial-Resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2011-2014. *Infect control hosp epidemiol*, 37(11), 1288-1301. doi:10.1017/ice.2016.174
69. Wordpress, S. Glosario de Biología Celular y Molecular. (2015) En línea de: <https://scykness.wordpress.com/2013/10/20/glosario-de-biologia-celular-y-molecular/>
70. Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1151-1161.

GLOSARIO

Acuaporinas: Proteínas que funcionan como canales regulados de agua. Estas proteínas de canal facilitan el transporte rápido de agua mediante la membrana plasmática en respuesta a gradientes osmóticos. ⁽⁶⁹⁾

Alelo: Un alelo es cada una de las dos o más versiones de un gen, el término alelo fue usado originariamente para describir variaciones entre los genes, ahora también se refiere a las variaciones en secuencias de ADN no codificante (es decir, que no se expresan). ⁽⁴⁶⁾

Clon: Copia idéntica de una secuencia de ADN, o de todo un gen, o de un ser vivo. Una o más células derivadas de un solo antecesor e idénticas a éste. ⁽²²⁾

Clonal-Clonalidad: Del clon (un individuo reproducido a partir de una célula originaria) o relacionado con él. *expansión clonal*. ⁽⁵¹⁾

DNA Polimerasa: Enzima que copia una hebra de DNA (la hebra molde) para formar la hebra complementaria, que compone una nueva molécula de DNA de hebra doble. Todas las DNA polimerasas añaden desoxirribonucleótidos de a uno por vez en la dirección 5´a 3´ al extremo 3´de un cebador corto preexistente de DNA O RNA. ⁽⁶⁹⁾

Electroforesis: Técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido, a través de una matriz porosa; como agarosa o poliacrilamida, o bien en disolución. Dependiendo de la técnica que se use, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa. ⁽⁶⁹⁾

Elemento genético móvil: Secuencias de ADN que poseen la capacidad intrínseca de cambiar de posición dentro del genoma. Ejemplo: secuencias de inserción, transposones y plásmidos. ⁽²⁰⁾

Enzima de restricción: (o endonucleasa de restricción) es aquella que puede reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de DNA y cortarlo en ese punto en concreto, llamado sitio o diana de restricción, o en un sitio no muy lejano a éste, dependiendo de la enzima. Los sitios de restricción cuentan con entre 4 y 12 pares de bases, con las que son reconocidos. ⁽⁶⁹⁾

Genoma: Conjunto de genes y disposición de los mismos en la célula. El conjunto completo de ADN (material genético) en un organismo. En los seres humanos, casi cada célula contiene una copia completa del genoma. ⁽⁴⁷⁾

Hiperendémico: Presencia constante de enfermedades o agentes infecciosos dentro de un área geográfica o grupo de población determinados. También puede referirse a la prevalencia usual de una determinada enfermedad en dicha área o grupo. ⁽⁵³⁾

Housekeeping: En su traducción técnica “genes de mantenimiento” son típicamente genes constitutivos que se requieren para el mantenimiento de las funciones celulares basales que son esenciales para la existencia de una célula, independientemente de su papel específico en el tejido u organismo. Por tanto, se expresan en todas las células de un organismo en condiciones normales y patofisiológicas, independientemente del tipo de tejido, etapa de desarrollo, estado del ciclo celular o señal externa. Representan el conjunto mínimo de genes necesarios para mantener la vida. ⁽³²⁾

Iniciador o cebador (Primer): Un iniciador o cebador es una secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza PCR. En el método PCR se emplea un par de cebadores para hibridar con el ADN de la muestra y definir la región del ADN que será amplificada. También se les conoce como oligonucleótidos. ⁽⁴³⁾

KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*): Es el gen presente en una bacteria principalmente en *Klebsiella pneumoniae* que produce la enzima Carbapenemasa que confiere resistencia a antibióticos en especial a los Carbapenémicos. ⁽⁴⁰⁾

Locus: (del latín: lugar, plural loci): Posición que ocupa un determinado gen en un cromosoma. ⁽³⁶⁾

Macrorestricción: tienen la capacidad de cortar moléculas de ADN en sitios precisos mediante el uso de enzimas de restricción. ⁽⁶⁾

Multilocus sequence typing, (MLST), en español Tipificación multilocus de secuencias: Es una técnica genética para la caracterización taxonómica de bacterias y microorganismos por debajo del nivel de especie. El procedimiento caracteriza muestras de especies microbianas mediante la secuenciación de ADN de fragmentos internos de genes de mantenimiento. Se le asigna un número particular de alelo a cada secuencia única que se encuentre en un gen de mantenimiento de una especie. Cada muestra se caracteriza por las secuencias únicas de alelos en cada uno de los siete loci, lo cual constituye su perfil alélico o tipo de secuencia (en inglés sequence type, ST). ⁽³⁶⁾

Oligonucleótidos: véase *Iniciador o cebador (Primer)*.

Perítrico. (Biol. cel.) Rodeado de pelos, se aplica sobre todo a las bacterias provistas de flagelos. Formantes: perí (gr.) [alrededor de] + thrix (gr.) [pelo] + -ikos (gr. Dependiendo de su inserción en la célula se denominan perítricas si disponen sus flagelos por toda su superficie (*Escherichia coli*). En estas bacterias lo más habitual es que no funcionen todos los flagelos a la vez, sino que solo se muevan aquellos que impulsen a la bacteria en la dirección deseada. ⁽³⁾

Pulsotipos: Patrón de bandas característicos obtenidos de una electroforesis de campo pulsado. ⁽⁶⁹⁾

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN. El método utiliza secuencias cortas de ADN llamados cebadores para seleccionar la parte del genoma a amplificar. La temperatura de la muestra se sube y se baja repetidamente para ayudar a la enzima de replicación del ADN a duplicar la secuencia del ADN que está siendo copiada. Con esta técnica se pueden producir un billón de copias de la secuencia en estudio en sólo unas pocas horas. ⁽⁴³⁾

Replicación del ADN: (del latín *replere* = rellenar): Se refiere al uso de un ADN existente como molde para la síntesis de nuevas hebras de ADN. ⁽⁷⁾

Secuenciación del ADN: Es una técnica de laboratorio utilizada para determinar la secuencia exacta de las bases (A, C, G y T) en una molécula de ADN. ⁽⁴³⁾

Secuenciotipo (ST): Perfil alélico *véase Multilocus sequence typing, (MLST).*

Sideróforo: m. Molécula soluble que capta hierro para facilitar el transporte de este por los microorganismos. Suele ser específico del microorganismo que lo produce y, por ello, puede tener una acción antibiótica. Hay una gran variedad de

este tipo de moléculas (enteroquelina o enterobactina, aerobactina, micobactina, etc.). (44)

XBal: Cepa de E. Coli portadora del gen *Xanthomonas badrii* XBal (ATCC 11672)

ANEXOS

ANEXO N°1
FORMATO DE LA ENTREVISTA



TRABAJO DE GRADUACIÓN:

Tipificación con enfoques fenotípicos y genotípicos de aislamientos hospitalarios de *Klebsiella pneumoniae* productores de la carbapenemasa KPC-2.



Objetivo: Recopilar la información sobre el uso de métodos y técnicas empleadas en los centros de salud/investigación encargados del monitoreo de la resistencia bacteriana en El Salvador.

Institución: _____

Persona entrevistada: _____

Cargo dentro de la institución: _____

1. ¿Qué métodos o técnicas se utilizan en la identificación de resistencia bacteriana en El Salvador en forma general?

2. ¿Qué método o técnica utiliza este centro de salud/investigación para la identificación de resistencia bacteriana?

3. ¿Al obtener los datos sobre resistencia bacteriana que se hace con estos datos?

4. ¿Qué se hace con los aislamientos que se identifican como resistentes?

Se almacenan _____

Se descartan _____

Otro, _____

5. ¿Cree que es necesario mejorar los métodos o técnicas para la identificación de resistencia bacteriana?

Si _____

No _____

¿Por qué? _____

6. ¿Tiene algún conocimiento sobre los métodos y técnicas de biología molecular en la identificación de resistencia bacteriana? Si la respuesta es sí, ¿Cuáles?

Si _____

No _____

¿Cuáles? _____

ANEXO N°2
LISTADO DE EQUIPOS, MATERIALES Y PREPARACIÓN DE
REACTIVOS Y BUFFERS

Determinación de la sensibilidad

Equipo y material

- Vitek 2 Compact
- Densitómetro
- Tarjetas de identificación GN
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y 2.0 ml
- Asa estéril
- Tubos de ensayo.

Reactivos

- Agar TSA
- NaCl 0.45% - 0.5%

Identificación fenotípica de la presencia de β -lactamasas de tipo KPC mediante ensayos de difusión en medio sólido

Equipo y material

- Incubadora
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y 2.0 mL
- Tubos de ensayo
- Asa estéril

Reactivos

- Agar Müller Hinton
- Agar TSA
- Discos de ácido fenil borónico 300 μ g
- Discos de Imipenem 10 μ g
- Discos de Meropenem 10 μ g
- Discos de Cefotaxima 30 μ g

- Discos de Amoxicilina/Acido clavulánico 30 µg/10 µg
- Discos de Ceftazidima 30 µg
- Discos de Piperacilina/Tazobactam 100 µg/ 10 µg
- Solución salina 0.85%

Detección de los genes codificantes de KPC (*bla_{KPC}*) en los aislamientos en estudio mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Extracción de ADN total₍₅₉₎ (ver anexo N°3)

Equipo y material

- Espectrofotómetro
- Microcentrífuga
- Refrigeradora de -20°C a -70 °C
- Hot Plate
- Micropipetas de 10 a 1000 µL
- Puntas para micropipetas estériles

Reactivos

- Medio LBA
- Ceftazidima
- Agua desionizada estéril

Extracción de ADN plasmídico₍₅₉₎ (Ver anexo N°4)

Equipo y material

- Microcentrífuga
- Incubadora
- Vortex
- Tubos de microcentrífuga de 0.2 ml, 1.5 ml y 2.0 ml

Reactivos

- Caldo LB
- Buffer E
- Solución de Lisis suplementada RNAsa
- Fenol-Cloroformo-isoamilico (24:24:1)
- NaCl 5M
- Etanol 70%

Amplificación génica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ver anexo N° 5)

Equipo y material

- Termociclador
- Micropipetas de 10 a 1000 μ L
- Puntas para micropipetas estériles
- Tubos de microcentrífuga de 0.2 ml, 1.5 ml y 2.0 ml

Reactivos

- Agua desionizada estéril

Visualización de los productos amplificados en la PCR (Ver Anexo N°6)

Equipo y material

- Balanza analítica
- Hot plate
- Cámara de electroforesis
- Transiluminador UV
- Molde de geles y peine para pocillos

- Micropipetas de 10 a 1000 μ L
- Puntas para micropipetas estériles

Reactivos

- Agarosa
- Buffer TAE
- Buffer TBE
- Bromuro de etidio
- Buffer de carga

Macrorrestricción del genoma de *K. pneumoniae* con XbaI seguido por electroforesis de campo pulsado (PFGE).

Equipo y material

- Microcentrífuga
- Micropipetas de 10 a 1000 μ L
- Puntas para micropipetas estériles
- Tubos de microcentrífuga de 0.2 ml, 1.5 ml y 2.0 ml
- Espectrofotómetro UV
- Celda descartable para UV
- Vortex
- Refrigeradora
- Moldes para plugs
- Incubadora
- Papel parafilm

Reactivos

- Caldo BHI
- Buffer PIV
- Buffer de lisis

- Buffer ES-P
- Buffer TE 1X
- Buffer TE 0.1X
- Enzima de restricción Xbal
- Agarosa
- Buffer TBE 1X

Preparación de soluciones madre de buffer y reactivos

Buffer TAE 50X (59, 61, 62)

Para 1000 ml de Buffer

Tabla N° 23 Reactivos para buffer TAE 50X

Reactivo	Cantidad en g o de mL de Solución
TRIS base	242.0 g
Ácido acético glacial	57.1 ml
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	100 ml
Agua destilada c.s.p	1000 ml

Procedimiento:

1. Pesar 242.0 g de tris base y disolver en 400 ml de agua destilada.
2. Agregar 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M (pH 8,0)
3. Ajustar a volumen de 1000 ml con agua destilada.

Nota:

Diluya esta solución madre en una proporción (49:1) con agua destilada para una concentración 1X antes de usar, mediante la siguiente fórmula $C_1 V_1 = C_2 V_2$, esta solución de trabajo 1X contendrá Tris 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM.

Buffer TBE 10X (59, 61, 62)

Para 1000 ml de Buffer

Tabla N° 24 Reactivos para buffer TBE 10X

Reactivo	Cantidad en g o de mL de Solución
TRIS base	108.0 g
Ácido bórico	55.0 g
EDTA 0.5 M (pH 8.0)	40 ml
Agua destilada c.s.p	1000 ml

Procedimiento:

1. Pesar el 108.0 g tris base y disolver en 400 ml de agua destilada.
2. Agregar 55.0 g de ácido bórico y 40 ml de EDTA 0.5 M (pH 8,0)
3. Ajustar a volumen de 1000 ml con agua destilada.

Nota:

Diluya esta solución madre en una proporción (10:1) con agua destilada para una concentración 1X antes de usar, mediante la siguiente fórmula $C_1 V_1 = C_2 V_2$, esta solución de trabajo 1X contendrá Tris 0.13 mM, ácido bórico 45 mM y EDTA 2.5 mM.

NaCl 5M

Para 1000 ml de Stock NaCl 5M

Tabla N° 25 Reactivos para Stock NaCl 5M

Reactivo	Cantidad en g o de mL de Solución
NaCl	292.2 g
Agua destilada c.s.p	1000 ml

Preparación de Buffers para extracción de ADN Plasmídico (21)

Buffer E⁽⁵⁹⁾

Tris acetato ajustado a pH 7.9 con ácido acético glacial

Solución de lisis

Para 100 ml de solución

Tabla N° 26 Reactivos para solución de lisis

Reactivo	Cantidad en g o de mL de Solución	Concentración final en la solución
SDS	3.0 g	3%
TRIS base	0.6057 g	50 mM (pH 12.6)
ARNasa (20mg/mL)	3 μ L	20 μ g/ml
Agua ultrapura c.s.p	100 ml	-

Procedimiento:

1. Pesar el SDS y TRIS base
2. Disolver en 100 ml de agua ultrapura
3. Agregar 1.6 ml de NaOH 5N para ajustar a pH 12.6 la solución.
4. Esterilizar por calor húmedo en autoclave.
5. Enfriar y agregar 3 μ L de RNasa

Preparación de Buffers para PFGE

Buffer PIV pH 7.6

Para 500 mL de Buffer

Tabla N° 27 Reactivos para buffer PIV pH 7.6

Concentración final en el Buffer	Cantidad en g o ml de solución a partir de otras concentraciones
1M TRIS pH 7.6	100 ml de una solución TRIS 5 M, pH 8.0
1M NaCl	29.2 g NaCl
Agua destilada C.S.P	500 mL

Procedimiento:

1. Pesar 29.2 g de NaCl y disolver en 200 mL de agua destilada
2. Agregar 100 mL de TRIS 5M
3. Esterilizar por calor húmedo en autoclave

Buffer de Lisis pH 7.6

Para 500 mL de Buffer

Tabla N° 28 Reactivos para buffer de lisis pH 7.6

Concentración final en el Buffer	Cantidad en g o ml de solución a partir de otras concentraciones
1M TRIS pH 7.6	100 ml de una solución TRIS 5 M, pH 8.0
1M NaCl	29.2 g NaCl
100 Mm EDTA pH 7.6	100 ml de EDTA. 0.5 M pH 8.0
0.2% Na-Deoxicolato	1 g Na-Deoxicolato
0.5% Laurilsarcosina-Na	2.5 g Laurilsarcosina-Na
0.5% BRIJ-58	2.5 g BRIJ-58
Agua destilada C.S.P	500 mL

Procedimiento:

1. Pesar 29.2 g NaCl, 2.5 g de Na-Deoxicolato, 2.5 g Laurilsarcosina-Na y 2.5 g BRIJ-58.
2. Disolver en 400 mL
3. Esterilizar por calor húmedo en autoclave.

4. Agregar 1 mg/ml de Lisosima pH 7.6 y
5. Agregar 50 µg/ml Ribonucleasa A al momento de uso.

Buffer ES-P

Para 500 mL de Buffer

Tabla N° 29 Reactivos para buffer ES-P

Concentración final en el Buffer	Cantidad en g o ml de solución a partir de otras concentraciones
0.4 M EDTA	74.45 g EDTA
1% Laurilsarcosina-Na	5 g Laurilsarcosina-Na
Agua destilada C.S.P	500 mL

Procedimiento:

1. Pesar el EDTA y disolver en 400 ml. de agua destilada.
2. Ajustar a pH 9.0 agregando grageas de NaOH.
3. Agregar 5 g de laurilsarcosina-Na.
4. Ajustar a volumen a 500 ml con agua destilada.
5. Esterilizar por calor húmedo en autoclave.
6. Agregar la cantidad de proteinasa K según la tabla N°30

Tabla N°30 Cantidades de proteinasa K para agregar al Buffer ES-P: (Buffer ES 3+ Proteinasa K*)

Sc. Stock	1 Plug	10 Plugs	15 Plugs	20 Plugs	Cn. Final
Buffer ES	1 ml	10 ml	15 ml	20 ml	1 X buffer ES
Proteinasa K	0.5 mg	5 mg	7.5 mg	10 mg	0.5 mg/ml P. K

Nota: Pesar Proteinasa K y disolver en Buffer ES. La solución de Proteinasa K debe prepararse en el momento de su uso.

Buffer TE 1X pH 7.5

Para 500 mL de Buffer

Tabla N°31 Reactivos para buffer TE 1X pH 7.5

Concentración final en el Buffer	Cantidad en g o ml de solución a partir de otras concentraciones
5 mM TRIS	500 µl de TRIS 5 M
5 mM EDTA	5 ml de EDTA 5 M
Agua destilada C.S.P	500 mL

Procedimiento:

1. Medir 500 µl de TRIS 5 M y agregar en 200 mL de agua destilada
2. Medir 5 ml de EDTA 5 M y agregar en 200 mL de agua destilada
3. Ajustar a 500 mL de agua destilada y pH 7.5
4. Esterilizar por calor húmedo en autoclave.

ANEXO N°3
ESQUEMA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD POR
SISTEMA AUTIMATIZADO



Figura N°39 Esquema para la determinación de la sensibilidad usando el equipo VITEK 2 Compact

ANEXO N°4
ESQUEMA DE EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL



LBA + Ceftazidima (CAZ) (20ug/mL)



Resuspender 2-4 colonias aisladas



BM por 10 Min



Por 2 min a 13,000 RPM



Conservar a -20°C

Figura N° 39 Esquema de Extracción de ADN total

ANEXO N° 5
ESQUEMA DE EXTRACCIÓN DE ADN PLÁSMIDICO

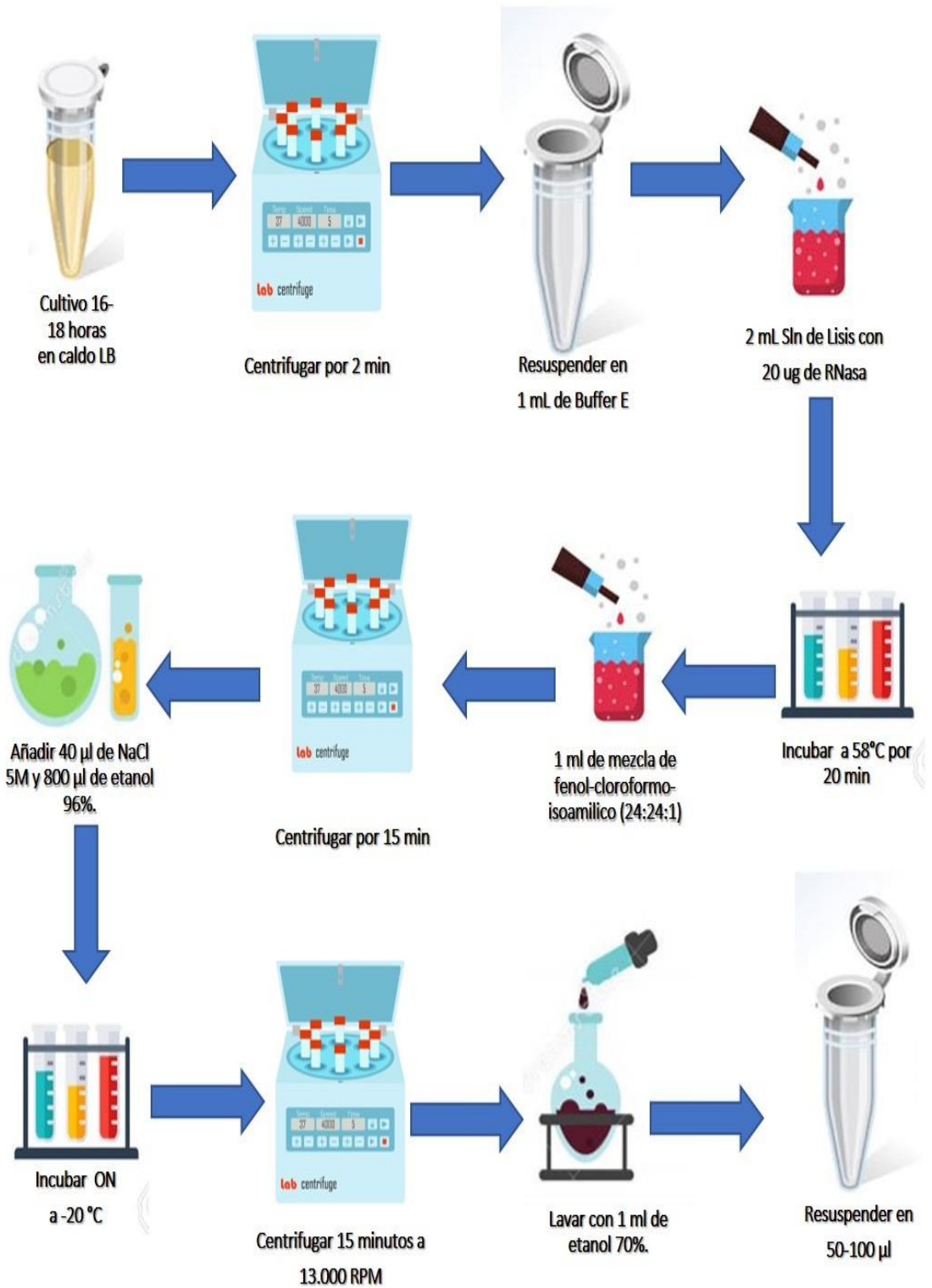


Figura N° 40 Esquema de Extracción de ADN plásmidico

ANEXO N° 6
**DETECCIÓN DE *bla_{KPC}* POR AMPLIFICACIÓN GÉNICA POR
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

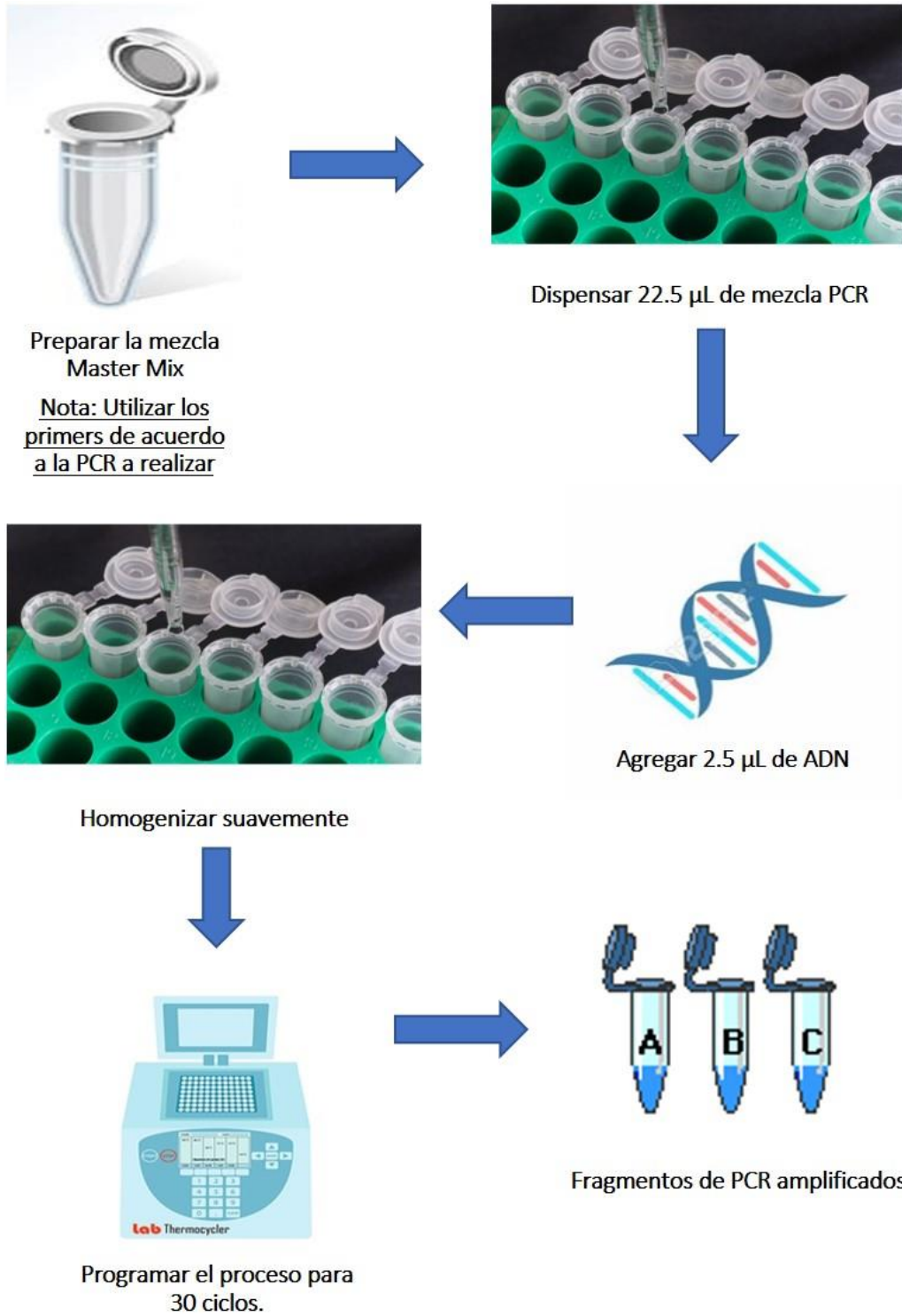


Figura N° 41 Detección de *bla_{kpc}* por amplificación génica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

ANEXO N° 7
PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA Y VISUALIZACIÓN DE LOS
PRODUCTOS AMPLIFICADOS EN LA PCR

Preparación de geles de agarosa al 0.5%, 0.8%, 1.0% y 1.5%

Preparación por cada 100 ml

Tabla N° 31 Cantidades de agarosa para la preparación de geles al 0.5%, 0.8%, 1.0% y 1.5%

Cantidad Reactivo	Agarosa al 0.5%	Agarosa al 0.8%	Agarosa al 1.0%	Agarosa al 1.5%
Agarosa	0.5 g	0.8 g	1.0 g	1.5 g
Buffer (TAE o TBE)	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Bromuro de etidio (10mg/ml)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl

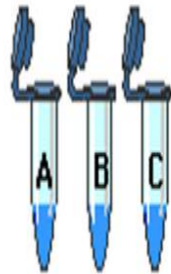
Procedimiento:

1. Pesar la cantidad de agarosa según se requiera para la concentración del gel como lo muestra la tabla N°31.
2. Calentar el buffer y agregar la cantidad de agarosa determinada
3. Disolver en el buffer
4. Llevar a una temperatura de 30°C y agregar el bromuro de etidio como muestra la tabla.
5. Seguir con la preparación del gel como muestra la figura N°42

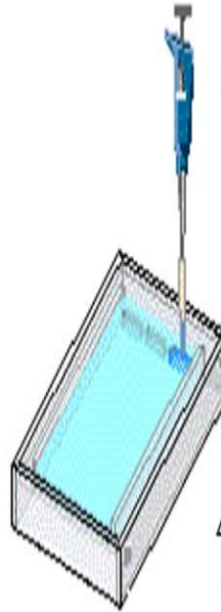
1. Elaboración del gel de agarosa



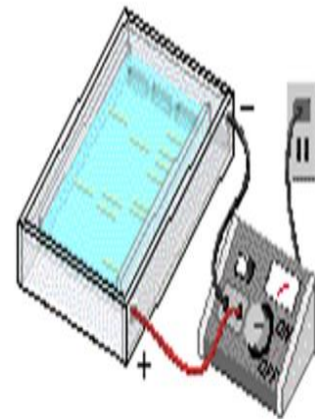
2. Fragmentos de ADN Amplificados



3. Cargar los fragmentos de ADN amplificados en gel de agarosa



4. Separar los fragmentos mediante electroforesis



5. Gel de agarosa con bandas de diferentes pesos moleculares

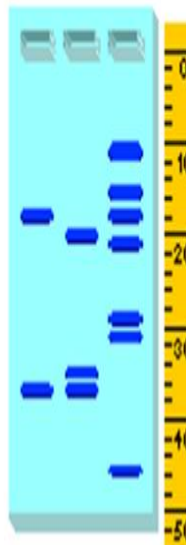


Figura N° 42 Preparación del gel de agarosa y visualización de los productos amplificados en la PCR

ANEXO N° 8
ESQUEMA DEL PROCESO DE ELECTROFORESIS DE CAMPO
PULSADO PFGE

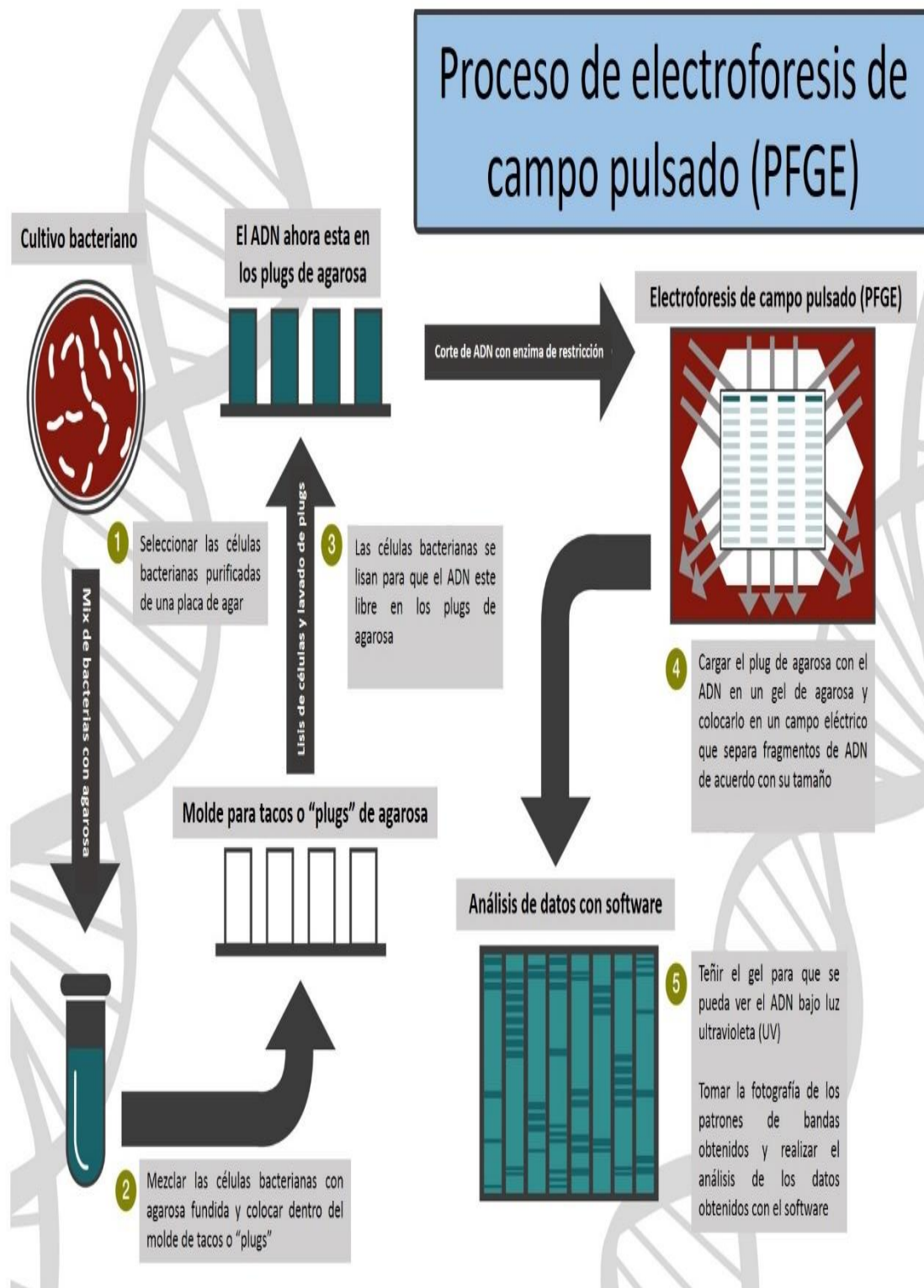


Fig. N° 43 Esquema del proceso de electroforesis de campo pulsado PFGE