



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magíster en Ciencias mención Microbiología

# **Plásmidos relacionados a *bla*<sub>KPC</sub> en cepas de enterobacterias chilenas productoras de carbapenemasas**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Microbiología

JULIETA SOLEDAD GEISSE LEMA  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2017

Profesor Guía: MSc. Mariana Domínguez Yévenes  
Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA) Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor tutor

---

MSc. Mariana Domínguez Yévenes  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



---

Dr. Gerardo González Rocha  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dra. María Angélica Mondaca Jara  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dra. Violeta Morín Muñoz  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Director de Programa

---

Dr. Víctor Campos Araneda  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## DEDICATORIA



*A mi familia*

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis fue financiada por Beca Magíster CONICYT 22130980 y Proyecto FONDECYT 1130838.

Quiero agradecer en primer lugar a la profesora Mariana, ya que fue quien me recibió en el laboratorio, y es también con quién terminé este ciclo académico. Le agradezco la eterna paciencia que ha tenido conmigo, por siempre tener palabras de ánimo y preocuparse de sus alumnos, y también de mí, más allá del deber académico, por darle sentido a mis enredos. También agradezco por su apoyo a los profesores Gerardo y Helia, quienes junto a la profesora Mariana han hecho del laboratorio un lugar acogedor para trabajar. A pesar de ser los profes, siempre se han esforzado por dar esa esencia de familia al laboratorio, que no siempre se encuentra en otros lugares de trabajo. También agradezco a la profesora María Angélica Mondaca y profesor Carlos Smith, por siempre estar preocupados por sus alumnos, tanto en lo académico como en lo personal, gracias por su apoyo y palabras de ánimos.

Les agradezco a mis compañeras de laboratorio, las chicas "Lú", por dar ese toque de alegría en el trabajo, por hacer el laboratorio un lugar donde se llega con agrado siempre.

También quiero agradecer a: América, Marisel y Alejandra, por su constante amistad, no importa la distancia o el tiempo, siempre me apoyaron y estaban ahí para dar ánimos (o el reto justo). Y también doy las gracias a la profesora Cecilia, quien siempre me alentó.

Doy gracias a mi familia, mi madre, hermana y sobrina, que nunca entendieron lo que hago, pero me han apoyado y dado su cariñosa comprensión en todas mis fases de ánimos y locuras durante mis estudios y trabajo.

Y por último, y no menos importante, doy gracias a Dios, que como dicen, a veces apretaba, pero no ahogaba, fue difícil terminar, pero se pudo. Gracias.....

## TABLA DE CONTENIDOS

Índice de tablas.....	vii
Índice de figuras.....	viii
<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Aspectos generales sobre resistencia a carbapenémicos.....	1
1.2 Carbapenemasas.....	3
1.3 Carbapenemasas KPC y su distribución.....	7
1.4 <i>bla</i> <sub>KPC</sub> y elementos genéticos móviles.....	12
1.5 Antecedentes de KPC en Chile.....	14
1.6 Hipótesis.....	16
1.7 Objetivo general.....	16
1.8 Objetivos específicos.....	16
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
2.1 Cepas bacterianas.....	17
2.2 Extracción de ADN total.....	19
2.3 Determinación de grupos de incompatibilidad de plásmidos.....	19
2.3.1 Electroforesis de productos PCR.....	21
2.4 Estudio de perfil plasmídico.....	21
2.4.1 Extracción de ADN plasmídico.....	21
2.4.2 Electroforesis en gel de agarosa.....	23
2.5 Detección de plásmido portador de gen <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> .....	23
2.5.1 Construcción de la sonda.....	23
2.5.2 Extracción de banda de ADN plasmídico hibridado con gen <i>bla</i> <sub>KPC</sub> desde gel de agarosa y determinación del grupo de incompatibilidad.....	24
2.6 Secuenciación de replicón.....	24

<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
3.1 Estudio de perfil plasmídico.....	27
3.2 <i>Southern blot</i> .....	30
3.3 Determinación de grupos de incompatibilidad del plásmido portador del gen <i>bla</i> <sub>KPC</sub> .....	34
3.4 Secuenciación de replicón.....	39
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>45</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>52</b>
<b>6. PROYECCIONES</b> .....	<b>53</b>
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	<b>54</b>



## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Características genéticas de enterobacterias productoras de enzima KPC-2 de diferentes centros de salud chilenos.....	18
<b>Tabla 2.</b> Cepas bacterianas utilizadas como controles para el análisis de plásmidos de grupos de incompatibilidad representativos en enterobacterias.....	18
<b>Tabla 3.</b> Partidores utilizados para determinación de grupos de incompatibilidad mediante PCR simple.....	20
<b>Tabla 4.</b> Partidores utilizados para la determinación de grupos de incompatibilidad mediante PCR múltiple.....	22
<b>Tabla 5.</b> Grupos de incompatibilidad de plásmidos en cepas de enterobacterias productoras de enzima KPC-2 aisladas en centros de salud chilenos.....	27
<b>Tabla 6.</b> Tamaño aproximado (ca.) de las bandas de ADN plasmidial de cepas de enterobacterias productoras de KPC-2.....	29
<b>Tabla 7.</b> Características de plásmidos portadores del gen <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> en cepas de enterobacterias aisladas en hospitales chilenos.....	38
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de PCR del grupo de incompatibilidad FIB de los plásmidos portadores del gen <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> de las cepas <i>E. coli</i> UC327 y <i>E. cloacae</i> UC347.....	42
<b>Tabla 9.</b> Porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de PCR del grupo de incompatibilidad Frep de los plásmidos portadores del gen <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> de las cepas <i>E. coli</i> UC327, <i>K. pneumoniae</i> UC338 y <i>E. cloacae</i> UC347.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Espectro de actividad de carbapenemasas en enterobacterias .....	6
<b>Figura 2.</b> Características epidemiológicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de KPC.....	10
<b>Figura 3.</b> Análisis producto de PCR del gen <i>bla<sub>KPC</sub></i> (893 pb) en cepas de enterobacterias productoras de KPC-2 aisladas en diferentes centros hospitalarios chilenos.....	26
<b>Figura 4.</b> Perfil plasmídico de cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasa KPC-2 aisladas en hospitales chilenos.....	28
<b>Figura 5.</b> Film y perfil plasmídico de cepas de enterobacterias portadoras de gen <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> y análisis por <i>Southern blot</i> de ADN plasmidial a 43°C.....	31
<b>Figura 6.</b> Film y perfil plasmídico de cepas de enterobacterias portadoras de gen <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> y análisis por <i>Southern blot</i> de ADN plasmidial a 45°C.....	32
<b>Figura 7.</b> Film y perfil plasmídico de cepas de enterobacterias portadoras de gen <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> y análisis por <i>Southern blot</i> de ADN plasmidial a 49°C.....	33
<b>Figura 8.</b> Análisis producto de PCR del gen <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> en ADN plasmidial purificado desde gel de agarosa.....	35
<b>Figura 9.</b> Análisis producto de PCR de los grupos de incompatibilidad IncFIB e IncFrep en plásmidos portadores del gen <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> de cepas de enterobacterias aisladas en hospitales chilenos .....	36
<b>Figura 10.</b> Análisis producto de PCR de los grupos los de incompatibilidad IncN en plásmidos portadores del gen <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> de cepas de enterobacterias aisladas en hospitales chilenos.....	37
<b>Figura 11.</b> Alineamiento de secuencias del grupo de incompatibilidad IncFIB (416 pb) de plásmidos portadores de <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> .....	40
<b>Figura 12.</b> Alineamiento de secuencias del grupo de incompatibilidad IncFrep (215 pb).....	43



## RESUMEN

*Klebsiella pneumoniae* es uno de los bacilos Gram negativos resistentes a antibióticos más frecuentemente aislados de infecciones asociadas a atención en salud en Chile. A nivel mundial, la mayor morbimortalidad se presenta con las cepas que sintetizan carbapenemasas que inactivan los antibacterianos utilizados como última línea de tratamiento.

Desde la primera detección de un aislado de *K. pneumoniae* productor de la carbapenemasa KPC, en 1996 en Carolina del Norte, la distribución geográfica de esta enzima y su hospedador se ha ampliado de forma alarmante. En Chile no se había informado casos de infecciones por enterobacterias productoras de esta carbapenemasa hasta marzo del año 2012, cuando se aisló una cepa de *K. pneumoniae* en un paciente proveniente de Italia. Posteriormente, se comienza a informar aislamientos autóctonos de diversas especies de la familia Enterobacteriaceae productores de KPC-2. Hasta el momento no se dispone de información sobre los plásmidos en donde se encuentra el gen codificante de la enzima KPC-2 en las cepas aisladas en Chile. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis fue identificar y determinar el grupo de incompatibilidad de los plásmidos en los cuales está localizado el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> en las primeras cepas de enterobacterias aisladas en hospitales chilenos.

Se trabajó con 8 cepas de enterobacterias productoras de KPC-2, aisladas en diferentes centros hospitalarios entre los años 2012 y 2014, proporcionadas por el Instituto de Salud Pública de Chile. Las cepas fueron seleccionadas de acuerdo a la especie bacteriana (*K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*) y las 4 cepas de *K. pneumoniae* de acuerdo al secuenciotipo y ambiente genético en que se encuentra el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>. En primer lugar, empleando ADN total se realizó un *screening* de los grupos de incompatibilidad de los plásmidos contenidos en cada cepa mediante el método de tipificación de replicón basado en PCR. Luego se extrajo el ADN plasmídico con el kit

comercial *DNA Zyppy Plasmid Miniprep*<sup>®</sup> y el plásmido portador del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> fue investigado por el método de transferencia alcalina e hibridación por *Southern blot*. Las bandas plasmídicas que hibridaron con la sonda marcada fueron cortadas desde el gel de agarosa para obtener el ADN correspondiente. La presencia del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> fue verificada por PCR y luego se detectó el grupo de incompatibilidad de los plásmidos. Los productos de PCR del análisis de los grupos de incompatibilidad fueron enviados a secuenciar a MacroGen, Korea.

Se encontró que 7 de los 8 aislados presentaron más de un tipo de plásmido y la mayor diversidad de plásmidos fue encontrada en la cepa de *E. coli* UC327 (IncFIB, IncA/C, IncN e IncY). Mediante *Southern blot* se estableció que el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> está localizado en un plásmido de tamaño 146 Kb, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncF en las cepas de *E. coli* UC327, *K. pneumoniae* UC338 y *E. cloacae* UC347 y, específicamente, de la variante IncFIB en *E. coli* y *E. cloacae*. El plásmido que porta *bla*<sub>KPC-2</sub> en la cepa *K. oxytoca* se pudo aislar, y correspondió a un plásmido no tipificable. Se destaca que el plásmido de la cepa *E. coli* presenta dos sistemas de replicación, IncFIB e IncN, es decir, es un plásmido de la categoría multireplicón. Las secuencias de los replicones de los grupos de incompatibilidad IncFIB de las cepas de *E. coli* y *E. cloacae* presentaron una similitud >99% con sólo dos cambios nucleotídicos en la cepa de *E. cloacae*, evidenciando la misma identidad en cepas de diferentes especies.

Se concluye que el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> se localiza, principalmente, en variantes de plásmidos del grupo de incompatibilidad F de un tamaño de ca. 146 Kb, en cepas de enterobacterias correspondientes a los primeros casos detectados en Chile. Esta tesis aporta con la primera información, aunque limitada, de la identidad de plásmidos portadores del gen que codifica para la carbapenemasa KPC-2 en cepas chilenas de enterobacterias.

## ABSTRACT

*Klebsiella pneumoniae* is one of the antibiotic resistant gram-negative bacilli most frequently isolated from health care-associated infections in Chile. Worldwide, the higher morbidity and mortality is presented with strains that synthesize carbapenemases which inactivate last-line antibiotics. Since the first detection of a KPC carbapenamase-producing *K. pneumoniae* isolate, in 1996 in North Carolina, the geographical distribution of this enzyme and its host has spread at an alarming rate. In Chile there had not been informed of infections by organism producers of this carbapenemase until March of 2012, when a strain of KPC-2- *K. pneumoniae* was isolated from a patient coming from Italy. Subsequently, isolation of indigenous isolates Enterobacteriaceae producing KPC-2 began to be reported. So far no information about KPC-encoding plasmids in strains isolated in Chile is available. Therefore, the aim of this thesis was to identify and determine the incompatibility group of the plasmids in which is located the gene *bla*<sub>KPC-2</sub> in the first enterobacterial strains isolated in Chilean hospitals.

The study included 8 strains of Enterobacteriaceae producers of KPC-2, isolated in different hospitals between the years 2012 and 2014, provided by the Instituto de Salud Pública of Chile. The strains were selected considering the bacterial species (*K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*) and the 4 strains of *K. pneumoniae* according to the sequence type and the genetic environment of the gene *bla*<sub>KPC-2</sub>. First, a screening of incompatibility groups of the plasmids contained in each strain was carried out by the PCR-based replicon typing method using total DNA. Then plasmid DNA was extracted with DNA Zyppy Plasmid Miniprep® commercial kit and the plasmid carrying the gene *bla*<sub>KPC-2</sub> was detected by the alkaline transfer method and Southern blot hybridization. The plasmid bands that hybridized with labeled probe were cut from the agarose gel to obtain the corresponding DNA. The presence of gene *bla*<sub>KPC-2</sub> was verified by PCR

and then the incompatibility group of the plasmids was detected. The incompatibility groups PCR products were sent to MacroGen, Korea for sequencing.

It was found that 7 of the 8 isolates showed more than one plasmid and the greatest plasmid diversity was found in the strain of *E. coli* UC327 (IncFIB, C/IncA, IncN and IncY). Southern blot study revealed that the gene *bla*<sub>KPC-2</sub> is located on a plasmid of ca. 146 Kb, in the strains of *E. coli* UC327, *K. pneumoniae* UC338 and *E. cloacae* UC347 *bla*<sub>KPC-2</sub> is located on IncF-type plasmids and, specifically, the variant IncFIB in *E. coli* and *E. cloacae*. The *bla*<sub>KPC-2</sub>-carrying plasmid of *K. oxytoca* strain corresponded to a non-typeable plasmid. It is highlight that the plasmid of strain *E. coli* presented two replicons, IncFIB and IncN, thus corresponding to a multireplicon plasmid. The sequences of the IncFIB replicons of the strains of *E. coli* and *E. cloacae* presented a similarity >99% with only two nucleotide changes in the *E. cloacae* strain, demonstrating plasmid identity in strains of different species.

It is concluded that the gene *bla*<sub>KPC-2</sub> is mainly located on IncF plasmid of ca. 146 Kb in strains of Enterobacteriaceae isolated from the first cases detected in Chile. This thesis provides the first information, although limited, of the type of plasmids carrying the gene that encodes for the KPC-2 carbapenemase in Chilean enterobacterial strains.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Aspectos generales sobre resistencia a carbapenémicos.

El siglo 20 fue "el siglo de los antibióticos", marcado por el descubrimiento y el desarrollo continuo de nuevos compuestos cada vez más activos; sin embargo, no se dispone de nuevas familias de antimicrobianos en uso clínico desde los lipopéptidos en 1987 (Nordmann, 2014).

Los carbapenémicos pertenecen a la familia de compuestos  $\beta$ -lactámicos y corresponden a antibióticos con el espectro de actividad antibacteriana más amplio. Poseen actividad bactericida contra numerosas bacterias aerobias y anaerobias grampositivas y gramnegativas; por esta razón, son de primera elección en el tratamiento de infecciones asociadas a atención en salud (IAAS), principalmente, de aquéllas causadas por enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). A pesar de que fueron utilizados como monoterapia sólo para las infecciones más graves, se han vuelto ampliamente usados empíricamente en centros hospitalarios en donde las bacterias gramnegativas multirresistentes (MDR) son endémicas. Además, el carbapenémico ertapenem, que se puede dosificar una vez al día, se está utilizando en pacientes ambulatorios para el tratamiento de infecciones complicadas del tracto urinario y de la piel (Bush, 2013). Como resultado de este incremento en el uso de carbapenémicos, la resistencia también ha ido en aumento en las últimas décadas, con la aparición tanto de bacilos gramnegativos fermentadores como no fermentadores resistentes a estos compuestos (Bush, 2013; DeLeo *et al.*, 2014; Djahmi *et al.*, 2014).

En las últimas décadas se ha detectado la presencia de mecanismos de resistencia que pueden disminuir la actividad de los carbapenémicos, algunos de ellos inherentes a la especie bacteriana, y otros adquiridos mediante elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones (Djahmi *et al.*, 2014). Dos

mecanismos principales son responsables de la resistencia a carbapenémicos en Enterobacteriaceae: disminución de la permeabilidad de membrana externa por la pérdida de porinas en combinación con la hiperproducción de BLEE o  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC; y la producción de  $\beta$ -lactamasas capaces de hidrolizar carbapenémicos (carbapenemasas). Esto explica que *Klebsiella pneumoniae* presente elevada resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, lo cual es de gran importancia porque estos antibióticos -los más prescritos en todo el mundo- son bactericidas potentes. Dichas  $\beta$ -lactamasas son un grupo muy heterogéneo de enzimas que confieren distintos grados de resistencia (Djahmi *et al.*, 2014; Nordmann *et al.*, 2014).

En la clínica, las  $\beta$ -lactamasas de mayor importancia en la actualidad son las que se clasifican como BLEE y las carbapenemasas (Nordmann *et al.*, 2011; Djahmi *et al.*, 2014; Del Franco *et al.*, 2015). Las carbapenemasas difieren de las BLEE en que las segundas inactivan penicilinas y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, pero no carbapenémicos. Por el contrario, la mayoría de las carbapenemasas hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y también monobactámicos y carbapenémicos, de modo que ningún  $\beta$ -lactámico puede seguir siendo eficaz (Poirel *et al.*, 2012; Rapp y Urban, 2012; Nordmann, 2014). Además, las cepas aisladas productoras de carbapenemasas, a menudo son resistentes a diversos antibióticos de otras familias, por lo que se les asocia a perfiles de resistencia amplios, elevados niveles de resistencia, alto potencial de diseminación e infecciones con altas tasas de mortalidad (Djahmi *et al.*, 2014). Los elementos móviles (transposones, plásmidos) que participan en la adquisición de carbapenemasas también llevan determinantes de resistencia para muchas otras clases de antibióticos, con algunas resistencias combinadas en la región variable de los mismos integrones. Con frecuencia, varios plásmidos aparecen en el mismo aislado, proporcionando medios adicionales de acumular genes de resistencia (Bush, 2013; Chagas *et al.*, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2013), por lo que existe la creciente preocupación en la salud mundial debido a la asociación de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y a otras clases de antibióticos como aminoglicósidos, fluoroquinolonas, y cotrimoxazol, lo que reduce la posibilidad

de tratamiento de infecciones debido a las cepas resistentes a múltiples fármacos (Djahmi *et al.*, 2014).

Por lo tanto, las bacterias productoras de carbapenemasas, además, al ser multirresistentes e incluso panresistentes a antibióticos (es decir, resistente a todas las clases disponibles), pueden constituirse en callejones sin salida terapéuticos (Nordmann *et al.*, 2009).

## 1.2. Carbapenemasas.

La clasificación de las  $\beta$ -lactamasas de Ambler, propuesta en 1980, se basa en analogías de la secuencia aminoacídica y clasifica estas enzimas en 4 clases: A, B, C y D. Específicamente las enzimas con actividad de carbapenemasa se encuentran en las clases A, B y D.

### Carbapenemasas clase A

En la primera clase de Ambler se ubican diversos tipos de carbapenemasas, entre las que destacan las enzimas de tipo IMI, SME, NMC, GES y KPC, siendo KPC, acrónimo para *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, la que se describe con mayor frecuencia en la literatura (Cifuentes *et al.*, 2012; Velásquez *et al.*, 2013; Djahmi *et al.*, 2014; Nordmann, 2014; Del Franco *et al.*, 2015). Las tres primeras enzimas (tipo IMI, SME, NMC) son codificadas por genes cromosómicos, mientras que las dos últimas (GES y KPC, además de IMI-2, derivados de GES) se encuentran codificadas en genes plasmídicos, lo que explica su mayor facilidad de diseminación (Velásquez *et al.*, 2013; Djahmi *et al.*, 2014; Mathers *et al.*, 2015; Pitout *et al.*, 2015).

La enzima IMI se ha informado en cepas nosocomiales de *Enterobacter* spp., aisladas en Estados Unidos, Francia, Croacia, Finlandia, Argentina e Irlanda (Nordmann y Poirel, 2014), y está codificada por genes localizados en plásmidos. Además, este gen ha sido detectado en aislados bacterianos obtenidos de varios ríos de Estados Unidos (Aubron *et al.*, 2005). La enzima SME, identificada inicialmente en *S. marcescens*, ha sido informada esporádicamente en cepas en Estados Unidos y Canadá (Nordmann y Poirel, 2014). Las variantes del gen codificante de la enzima GES se han sido encontradas en *Pseudomonas aeruginosa* en África, donde se detectó la variante GES-2 en un único clon; en cambio GES-5 ha sido identificada tanto en enterobacterias como en *P. aeruginosa* en América del Sur (Brasil), como también se ha difundido a Turquía y Corea del Sur (Nordmann y Poirel, 2014).

### **Carbapenemasas clase B**

En la clase B se encuentran carbapenemasas que corresponden a metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs) porque requieren iones  $Zn^{++}$  para ejercer su actividad y, por lo tanto, son inhibidas por EDTA. A esta clase pertenecen las enzimas tipo VIM, (Verona metalo- $\beta$ -lactamasas), IMP y, más recientemente, NDM (Nueva Delhi MBL). Estas enzimas pueden hidrolizar todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, excepto los monobactámicos (aztreonam) y su actividad es inhibida por EDTA, pero no por ácido clavulánico (Djahmi *et al.*, 2014; Pitout *et al.*, 2015).

IMP-1 fue la primera MBL informada en Japón, en 1991, en *S. marcescens*. Desde entonces, las MBLs se han observado en todo el mundo y las más comúnmente encontradas son del tipo VIM, identificadas en todos los continentes (Nordman *et al.*, 2011).

Italia fue el primer país mediterráneo en reportar MBLs adquiridas, con aislamientos esporádicos de cepas productoras de VIM-4 como *K. pneumoniae* y *E. cloacae*. Desde entonces, los brotes hospitalarios individuales o esporádicos causados por cepas productoras de enzimas tipo VIM se describen en varias regiones de este país.



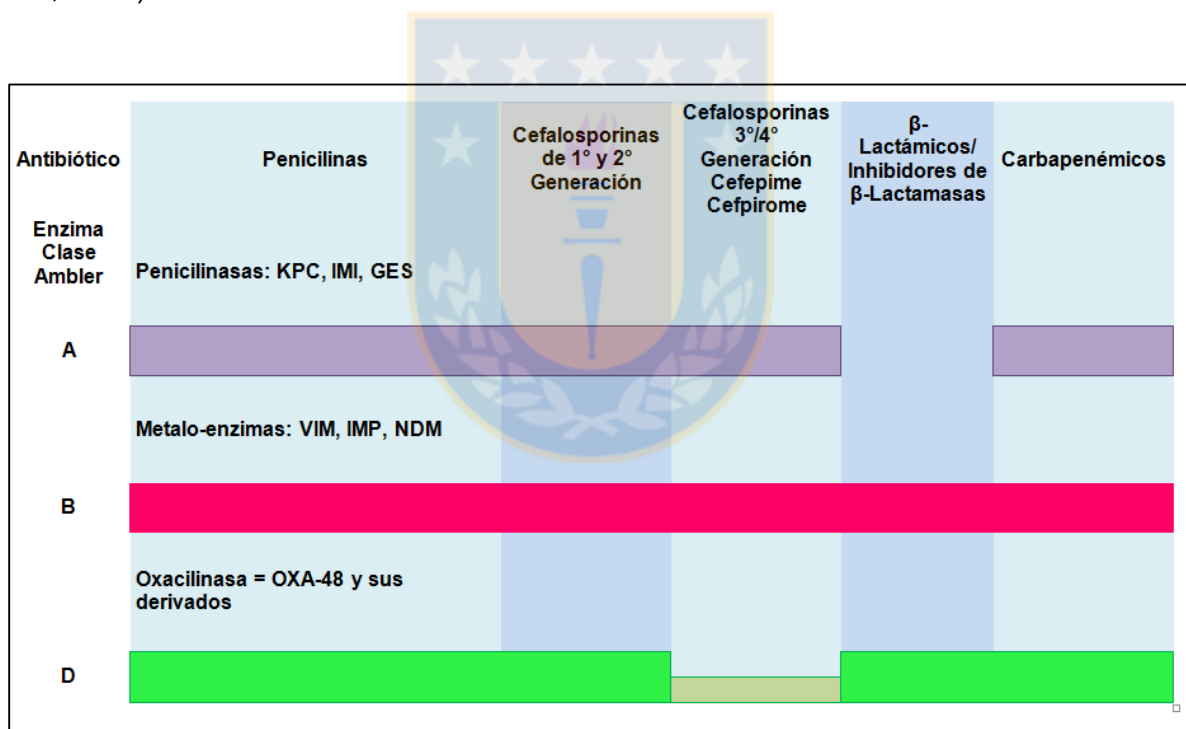
Por otra parte, se ha observado endemidad de cepas de *K. pneumoniae* productoras de VIM e IMP en Grecia (Walsh, 2010; Djahmi *et al.*, 2014).

Una de las metalo- $\beta$ -lactamasas más conocidas actualmente es NDM-1, descrita por primera vez en 2009 en Suecia, en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* aisladas desde un paciente sueco de origen indio, después de volver de Nueva Delhi. Las cepas productoras de enzimas NDM suelen ser resistentes a casi todos los antibióticos, excepto a tigeciclina y colistina (Djahmi y col, 2014; Nordmann, 2014; Pitout *et al.*, 2015). Cepas productoras de NDM han sido identificadas más tarde en diversas especies de enterobacterias, como *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. y *Citrobacter* spp. y, además, en *Acinetobacter baumannii* y luego en *Pseudomonas aeruginosa*. Una proliferación significativa, aunque más limitada se ha observado en Gran Bretaña, que tiene estrechos lazos con la India y Pakistán (Nordmann, 2014). De esta manera, la diseminación de estas enzimas se debe a que son codificadas en plásmidos altamente transmisibles que se propagan rápidamente entre las bacterias. Por otra parte, los genes que codifican para enzimas tipo VIM e IMP se encuentran en integrones, lo que ha favorecido también su diseminación (Djahmi *et al.*, 2014).

### **Carbapenemasas Clase D**

Corresponden a  $\beta$ -lactamasas tipo-OXA cuya actividad no es inhibida por EDTA, ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam, pero pueden ser inhibidas por NaCl *in vitro* (Djahmi *et al.*, 2014). Diversas variantes de carbapenemasas tipo OXA, especialmente, de los grupos OXA-23, OXA-40, OXA-51 y OXA-58, se han descrito en cepas de *Acinetobacter* spp. (Opazo *et al.*, 2012; Evans y Amyes, 2014; Opazo, 2014). Por el contrario, en Enterobacteriaceae OXA-48 es la principal enzima aislada en todo el mundo. Esta enzima hidroliza las penicilinas, pero tiene una actividad débil frente a carbapenémicos, cefalosporinas de tercera generación y aztreonam (Figura 1). Sin embargo, su frecuente asociación con BLEE, en particular CTX-M-15, aumenta el nivel de resistencia a carbapenémicos (Djahmi *et al.*, 2014; Pitout *et al.*, 2015).

OXA-48 fue inicialmente identificada en un aislado de *K. pneumoniae* en Turquía en el año 2001 y, en la actualidad, se reporta en varios países. Esta propagación no se relaciona con una diseminación clonal, ya que esta enzima no está vinculada exclusivamente a un sólo clon. El gen *bla*<sub>OXA-48</sub> se encuentra asociado con el transposón *Tn1999* o el transposón *Tn1999.2*, localizados en un solo plásmido transferible de 62,3 Kb que puede albergar, además, varios genes de resistencia y que se ha extendido geográficamente a diferentes cepas de enterobacterias (Poirel *et al.*, 2012). Así, OXA-48 se ha reportado, por ejemplo, en el norte de África, Libia, Egipto, Oriente Medio, Turquía, Croacia, Grecia, Israel, Italia, Líbano, , Eslovenia, España y Túnez (Poirel *et al.*, 2012; Djahmi *et al.*, 2014; Nordmann, 2014; Pitout *et al.*, 2015).



Fuente: modificada de Nordmann. Méd Mal Infect 2014. (44): Pag. 52

**Figura 1.** Espectro de actividad de carbapenemasas en enterobacterias (tomado de Nordmann, 2014).

### 1.3 Carbapenemasas KPC y su distribución.

Las  $\beta$ -lactamasas tipo KPC son un grupo de enzimas débilmente inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam, son carbapenemasas adquiridas, codificadas por genes transferibles localizados en elementos móviles, tales como plásmidos y transposones, los cuales se pueden diseminar entre cepas de una misma especie o diferentes especies (Andrade *et al.*, 2011; Chagas *et al.*, 2011; Giakkoupi *et al.*, 2011; Del Franco *et al.*, 2015). Las cepas portadoras de estas enzimas son resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, ya que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos (aztreonam) y carbapenémicos, pero no cefamicinas y, además, presentan resistencia a antibióticos de otras familias (Poirel *et al.*, 2011; Chagas *et al.*, 2011; Velásquez *et al.*, 2013; Nordmann, 2014).

Hasta el momento 23 variantes de KPC han sido descritas (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>) que difieren en uno o dos aminoácidos, están diseminadas globalmente y han sido identificadas, principalmente, en aislados clínicos de *K. pneumoniae*. De estas variantes, KPC-2 y KPC-3 son las predominantes, aunque KPC-2 es claramente la variante prevalente (Andrade *et al.*, 2011; Rapp y Urban, 2012; Djahmi *et al.*, 2014; Nordmann, 2014).

La primera carbapenemasa KPC (KPC-1), codificada por el gen  $bla_{KPC}$ , fue identificada por primera vez en Carolina del Norte durante el proyecto de vigilancia Epidemiología de Resistencia Antimicrobiana en Cuidados Intensivos (ICARE) en 1996 (Yigit *et al.*, 2001). Luego los casos de infecciones por *K. pneumoniae* productora de KPC se presentaron en forma esporádica, como brotes aislados, hasta alcanzar una amplia diseminación en 36 estados de Estados Unidos en el año 2010 (Mataseje *et al.*, 2011; Nordmann y Poirel, 2014; Partridge, 2014).

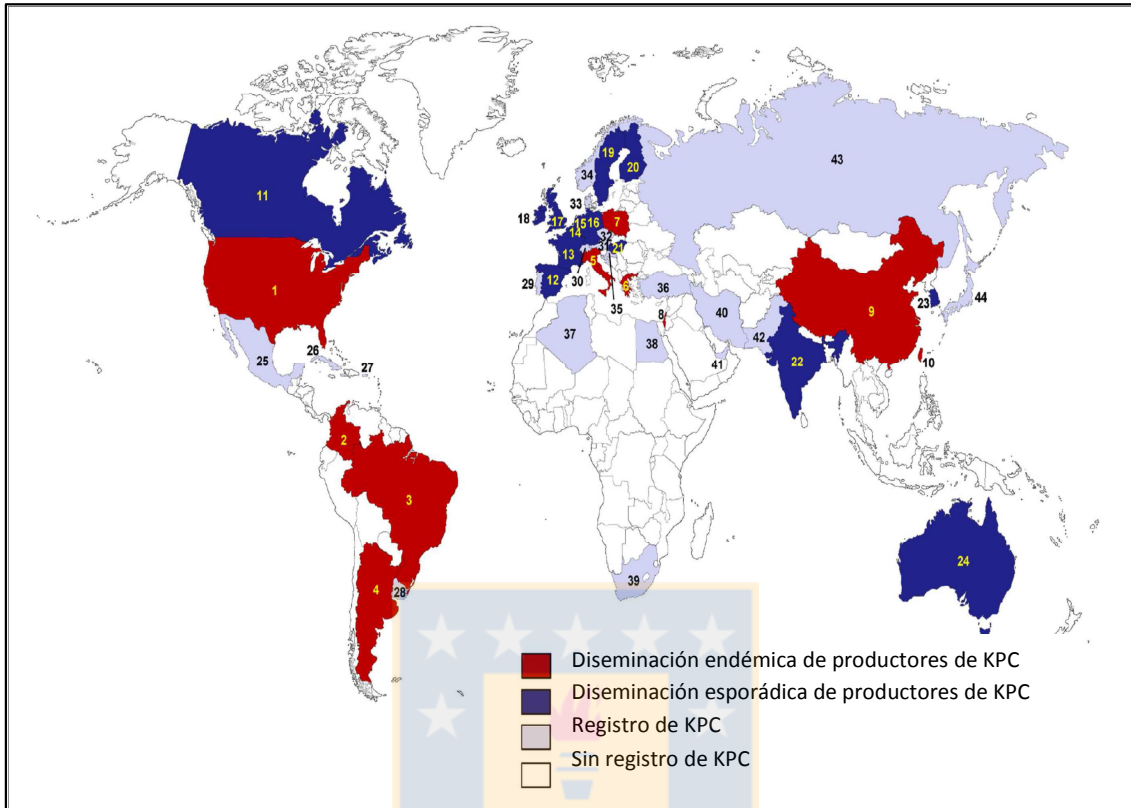
En pocos años, luego de la primera descripción de KPC en la costa este de Estados Unidos, y debido a su gran movilidad genética en plásmidos, los genes responsables de la síntesis de esta enzima y sus variantes se han diseminado ampliamente. De

esta manera, cepas portadoras de estas enzimas se han convertido en endémicas en muchos hospitales e instalaciones de cuidado a largo plazo (asilos de ancianos, hospicios, casas de acogida, casas hogares) en los Estados Unidos, con descripciones posteriores de *K. pneumoniae* productora de KPC en diversas regiones del mundo. Así, se detectó en Europa, en Francia en el 2005, en un paciente que regresaba de Nueva York (Ahn *et al.*, 2014; Nordmann, 2014). El principal foco endémico en Europa se encuentra en Grecia. Italia, afectada poco después de Grecia, ocupa el segundo lugar, pero Escocia, Alemania, Bélgica, Finlandia, los países escandinavos, Suiza también se ha visto afectada por este problema, con mayor frecuencia a través de Grecia e Italia, también en Israel, Asia (China) y América, con reportes esporádicos de otras localidades (Poirel *et al.* 2011; Chagas *et al.*, 2011; Cantón *et al.*, 2012; Kassis-Chikhani *et al.*, 2013; Naas *et al.*, 2013; Velásquez *et al.*, 2013; Ahn *et al.*, 2014; Nordmann, 2014; Partridge, 2014; Wang *et al.*, 2014). En Grecia, el primer caso fue registrado en un hospital en Creta en 2007 (Giakkoupi *et al.*, 2011). Al poco tiempo, los productores de KPC se convirtieron en los microorganismos multirresistentes prevalentes en los hospitales de la zona metropolitana de Atenas (Giakkoupi *et al.*, 2011). En el año 2009, estas cepas se aislaban casi exclusivamente en Grecia, y en el 2010 la tasa de cepas resistentes aumentó de menos de 5% a más de 10 y 25%, dentro de un año. Todos los hospitales italianos - en Roma, Milán, Verona, Venecia - ahora tienen que enfrentarse a la endemidad de cepas KPC (Cantón *et al.*, 2012; Nordmann, 2014).

En Israel, donde estos aislados han sido descritos como endémicos, los primeros casos fueron reportados en ocho hospitales y cinco centros de atención de pacientes crónicos, evidenciándose una relación genética entre las cepas de *K. pneumoniae* KPC-2 y KPC-3 con cepas de *K. pneumoniae* KPC-2 estadounidenses (Nordmann *et al.*, 2009). Estas cepas, principalmente *K. pneumoniae*, han sido descritas, además, en China y Taiwán (Nordmann, 2014).

En África, la diseminación de los genes de resistencia a carbapenémicos se hizo evidente cuando se detectó por primera vez la enzima KPC-2 en cepas de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* aisladas de una mujer hospitalizada el 2011 en Pretoria, al sur del continente (Brink *et al.*, 2012; Lee C *et al.*, 2016). Posteriormente, en 2013, se detectó el gen codificante para la enzima KPC-3 en un aislado de *K. pneumoniae* proveniente de un infante de Algeria, África del norte (Bakour *et al.*, 2015; Lee C *et al.*, 2016). En Egipto también se ha detectado variantes del gen *bla*<sub>KPC</sub> en catorce aislados de *K. pneumoniae* (Metwally *et al.*, 2013; Lee C *et al.*, 2016). En resumen, las cepas KPC se han extendido en gran medida, en enterobacterias (Figura 2), a través de pacientes colonizados y el transporte aéreo (Nordmann, 2014).

En América del Sur también se ha informado el aislamiento de enterobacterias resistentes a carbapenémicos; así, en el año 2005, Colombia fue el primer país que informó la presencia de infecciones por *K. pneumoniae* productoras de KPC y, posteriormente, la producción de esta enzima en varias enterobacterias. Subsecuentemente esta enzima fue descrita en Puerto Rico, en Trinidad y Tobago, seguido por Brasil, en el año 2006, Argentina en 2008, Venezuela, Chile en el año 2012, México, Uruguay y Cuba (Meletis *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011; Cifuentes *et al.*, 2012; Naas *et al.*, 2013; Gutiérrez *et al.*, 2013; Velásquez *et al.*, 2013; Nordmann, 2014; Martínez *et al.*, 2015; Mathers *et al.*, 2015; Ocampo *et al.*, 2015; Tavares *et al.*, 2015; Barría-Loaiza *et al.*, 2016; Kazmierczack *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2016;). Por otra parte, Oliveira *et al.* (2014). así como Machado *et al.* (2016), han publicado recientemente un estudio que informa la presencia de cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC-2 en ríos urbanos de un estado brasileño, con posible relación con cepas hospitalarias, reconociendo entre otras Enterobacteriaceae a *K. pneumoniae* como un importante reservorio para una variedad de determinantes de resistencia, lo cual es evidencia epidemiológica de que la diseminación ambiental de bacterias multirresistentes de alto riesgo está ocurriendo en Sudamérica. (Oliveira *et al.*, 2014).



Fuente: Lee *et al.* Front Microbiol 2016. (7): Pag. 3

**Figura 2.** Características epidemiológicas de *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC. (1) Estados Unidos; (2) Colombia; (3) Brasil; (4) Argentina; (5) Italia; (6) Grecia; (7) Polonia; (8) Israel; (9) China; (10) Taiwán; (11) Canadá; (12) España; (13) Francia; (14) Bélgica; (15) Países Bajos; (16) Alemania; (17) Reino Unido; (18) Irlanda; (19) Suecia; (20) Finlandia; (21) Hungría; (22) India; (23) Corea del Sur; (24) Australia; (25) México; (26) Cuba; (27) Puerto Rico; (28) Uruguay; (29) Portugal; (30) Suiza; (31) Austria; (32) República Checa; (33) Dinamarca; (34) Noruega; (35) Croacia; (36) Turquía; (37) Algeria; (38) Egipto; (39) Sudáfrica; (40) Irán; (41) Emiratos Árabes Unidos; (42) Pakistán; (43) Rusia; (44) Japón.

KPC ha ampliado su rango de hospedador por transferencia lateral de genes entre otras especies de la familia Enterobacteriaceae, como *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter freundii*, *S. marcescens* y, además, bacilos no fermentadores, específicamente *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. (Andrade *et al.*, 2011; Geffen *et al.*, 2012; Dortet *et al.*, 2013; Kassis-Chikhani *et al.*, 2013; Velásquez *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2014; Yao *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2015; Tavares *et al.*, 2015; Dotson *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2016).

La diseminación por todo el mundo de organismos productores de KPC se ha debido en gran medida a diferentes mecanismos, la diseminación de diferentes clones, la diseminación de diferentes secuenciotipos, además de mecanismos de transferencia horizontal de genes que contribuyen a la diseminación del gen de resistencia, como la asociación del gen a transposones y/o a plásmidos (Gómez *et al.*, 2011; Castanheira *et al.*, 2012; Geffen *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2013; Chmelnitsky *et al.*, 2014; Mathers *et al.*, 2015). En Estados Unidos se ha demostrado que la mayor parte de la diseminación de *K. pneumoniae* parece ser clonal, y ST258 da cuenta de aproximadamente 70% de todas las cepas enviadas al Centro de Control de Enfermedades (CDC), de acuerdo a lo publicado en el año 2009 (Cifuentes *et al.*, 2012). El clon ST258 se extendió a nivel mundial y se asocia, sobre todo, con la aparición y difusión de cepas productoras de KPC en diferentes países de América del Norte, Europa y Asia. El linaje de *K. pneumoniae* ST11, reportado por primera vez en Francia en 1997, es actualmente predominante en Asia, es un secuenciotipo que se ha detectado asociado al gen *bla*<sub>KPC-2</sub> en China y Corea del Sur (Cao *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2016), y también se ha detectado este elemento genético asociado a otros genes de resistencia en los Países Bajos, Noruega, Polonia, Portugal, España, Tailandia, Turquía, Estados Unidos, Grecia, Australia, República Checa, Brasil y Argentina (Andrade *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013; Mathers *et al.*, 2015; Pitout *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2016).

#### 1.4 *bla*<sub>KPC</sub> y elementos genéticos móviles.

La diseminación de la resistencia a los antimicrobianos en las bacterias Gram negativas se ha atribuido, en gran medida, al intercambio de ADN inter e intraespecie, siendo la transferencia horizontal de genes de resistencia, situados en plásmidos, el mecanismo predominante en el origen de la adquisición de resistencia en los patógenos bacterianos que causan infecciones, tanto adquiridas en la comunidad como asociadas a atención de salud (Carattoli, 2013). Los plásmidos adquieren elementos genéticos móviles como transposones y secuencias de inserción, que movilizan a los genes de resistencia a antimicrobianos, promoviendo la transferencia horizontal de determinantes de resistencia entre bacterias de diferentes especies y géneros (Carattoli, 2013; Mathers *et al.*, 2015; Pitout *et al.*, 2015).

Los estudios del entorno genético de *bla*<sub>KPC</sub> indican que su movilidad y diseminación se relacionan con el transposón *Tn4401*, relacionado a Tn3, que es transportado por plásmidos de amplio rango de hospedador, que varían en su estructura (Poirel *et al.*, 2011; Chagas *et al.*, 2011). El transposón *Tn4401* es un elemento de, aproximadamente, 10 Kb, que está delimitado por dos secuencias repetidas invertidas de 39 pb y alberga los genes de transposasa y resolvasa y dos secuencias de inserción, ISKpn6 y ISKpn7, además del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> (Cuzon *et al.*, 2011). Hasta la fecha, se ha descrito 7 isoformas (a-g) de este transposón sobre la base de deleciones de la secuencia río-arriba del gen *bla*<sub>KPC</sub>. Esta región incluye el promotor *bla*<sub>KPC</sub>, por lo tanto, las variaciones en esta zona influyen en el nivel de expresión del ARN mensajero de *bla*<sub>KPC</sub> (Ho *et al.*, 2013; Kassis-Chikhani *et al.*, 2013; Chmelnitsky *et al.*, 2014). Sin embargo, todos los transposones *Tn4401* descritos en el trabajo de Kassis, tienen gran parte de sus componentes y secuencias conservadas (Kassis-Chikhani *et al.*, 2013). Este transposón ha sido identificado en aislados de diferentes lugares geográficos y de diferentes secuenciotipos (ST) en enterobacterias y *Pseudomonas* spp. (Almeida *et al.*, 2012; Naas *et al.*, 2013). *Tn4401* se inserta en diferentes *loci* en plásmidos conjugativos y no conjugativos que varían en tamaño (12



a 150 Kb, aproximadamente) y grupo incompatibilidad (Cuzon *et al.*, 2011; Kassis-Chikhani *et al.*, 2013). La expansión de los clones y los plásmidos que han adquirido *Tn4401* parece haber impulsado la difusión de la pandemia de genes *bla<sub>KPC</sub>* (Andrade *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2013; Naas *et al.*, 2013; Chmelnitsky *et al.*, 2014; Anchordoqui *et al.*, 2015). Las posibles explicaciones para esta rápida difusión de los genes *bla<sub>KPC</sub>* serían que estos genes se encuentran localizados en elementos genéticos que se transfieren en una amplia variedad de plásmidos que varían en su naturaleza, además de la capacidad de las Enterobacteriaceae de aceptar fácilmente ADN externo (Cuzon *et al.*, 2011; Sheng *et al.*, 2012; Naas *et al.*, 2013; Carattoli, 2014; Chen *et al.*, 2014).

El gen que codifica para la enzima KPC se encuentra, en la mayoría de los casos, codificada en genes localizados en una variedad de plásmidos naturales auto-transferibles que se diferencian por su tamaño y tipo de replicón. La ubicación en un plásmido permite la transferencia horizontal entre bacterias de diferentes géneros y, por consiguiente, promueve la propagación del gen de resistencia a carbapenémicos (Chmelnitsky *et al.*, 2014; Pitout *et al.*, 2015). Un ejemplo de esto es lo que se reportó en un hospital de Michigan, en donde se detectó un plásmido portador de *bla<sub>KPC</sub>*, de alrededor de 95 Kb, en aislados pertenecientes a dos géneros de Enterobacteriaceae; estos aislados, uno de *C. freundii* y el otro de *Klebsiella oxytoca*, fueron obtenidos a partir de dos pacientes y producían la enzima KPC-2 (Rasheed *et al.*, 2008).

Una manera de clasificar de los plásmidos es de acuerdo al grupo de incompatibilidad. La incompatibilidad de un plásmido es definida como la incapacidad de dos plásmidos co-residentes en una célula de ser heredados conjuntamente de forma estable en ausencia de presión externa (Novick *et al.*, 1987). Esta característica forma las bases del sistema de clasificación de los plásmidos, especialmente en Enterobacteriaceae, en base al replicón que presentan estos elementos, al mecanismo de replicación y al control de replicación (Osborn *et al.*,

2000). Los plásmidos juegan hoy en día un papel importante en la difusión exitosa de carbapenemasas y muchos tipos de plásmidos se han asociado a estas enzimas; algunos pertenecen a familias raras (IncT) y otros a familias de plásmidos más comunes (IncA/C, IncL/M, IncF, IncI1, IncN) (Carattoli, 2013). Los genes *bla*<sub>KPC</sub> se han reportado en plásmidos tipificables, con estrecho (IncFIIk, ColE) y amplio (IncN, IncL/M e IncA/C) rango de hospedadores, y en plásmidos no tipificables (Carattoli, 2013; Carattoli *et al.* 2014; Mathers *et al.*, 2015; Pitout *et al.*, 2015). El gen *bla*<sub>KPC</sub> se ha identificado, principalmente, en plásmidos tipo IncA/C, IncF, IncL/M e IncN, también en plásmidos pequeños de replicación círculo rodante (RCR) que no son autotransferibles, pero pueden movilizarse en *trans* por plásmidos conjugativos co-residentes (Carattoli, 2013; Carattoli *et al.* 2014). Los plásmidos IncA/C son particularmente importantes, ya que muestran un rango de hospedador muy amplio, siendo capaces de replicarse, no solo en Enterobacteriaceae, sino también en *Pseudomonas* spp. y otras especies bacterianas (Carattoli, 2013).

Diversos plásmidos asociados a *bla*<sub>KPC</sub> han sido completamente secuenciados; los primeros fueron los plásmidos p9 (IncN, FJ223607), p12 (IncN, FJ223605) y p15S (ColE, FJ223606). Otros plásmidos completamente secuenciados corresponden a pKP048 (IncFIIk, FJ628167), pSLMT (IncFIIk, HQ589350), pKpQIL (IncFIIk, GU595196), pKpQIL-IT (IncFIIk, JN233705), pKPHS2 (IncFIIk, CP003224) y pKPN101-IT (IncFIIk, JX283456) (Ho *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014).

En resumen, la propagación de KPC involucra diseminación de clones y diseminación de genes *bla*<sub>KPC</sub> localizados en plásmidos y transposones.

### **1.5 Antecedentes de KPC en Chile.**

En Chile no se habían reportado casos de infecciones por enterobacterias productoras de KPC hasta marzo del año 2012 en que el primer aislamiento de una cepa de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC-2 fue realizado

desde un paciente procedente de Italia, incrementando la preocupación por este tema (Cifuentes *et al.*, 2012). El primer caso autóctono se presentó el 14 de abril de 2012 en la Región Metropolitana y desde estos primeros hallazgos hasta la fecha, se ha aislado 186 cepas de enterobacterias productoras de esta enzima (Instituto de Salud Pública de Chile, comunicación personal actualización de carbapenemasas en Chile, abril y octubre 2016), entre las que se encuentra *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *S. marcescens*, *C. freundii* y *E. cloacae*.

Debido a la relevancia de estos determinantes de resistencia por su amplia distribución, es importante la identificación y caracterización de elementos móviles, como los plásmidos, en las cepas productoras de KPC aisladas en nuestro país, así como conocer su potencial diseminación asociada a vectores específicos. Si bien los aislados con estos determinantes de resistencia se han asociado a infecciones asociadas a atención de salud, la gran capacidad de diseminación del gen *bla<sub>KPC</sub>* por transferencia de elementos genéticos móviles, pueden servir como vector para la transmisión entre especies (Cifuentes *et al.*, 2012; Geffen *et al.*, 2012).

Hasta el momento no se dispone de información sobre los plásmidos en donde se encuentra localizado el gen codificante de la enzima KPC-2 en las cepas aisladas en Chile; por tanto, esta tesis pretende aportar al conocimiento del perfil plasmídico de estas cepas y del grupo de incompatibilidad de los plásmidos en donde se localiza *bla<sub>KPC-2</sub>*, entregando información de importancia con respecto al potencial de diseminación de esta enzima a bacterias de relevancia en infecciones asociadas a atención de salud.

## 1.6 HIPÓTESIS

Según los antecedentes descritos, la propagación de KPC involucra diseminación de clones y diseminación de genes *bla*<sub>KPC</sub> localizados en plásmidos y transposones. Así, en cepas aisladas en diferentes lugares geográficos se ha observado una relación con respecto a la naturaleza de los plásmidos portadores del gen que codifica para la enzima KPC, por ejemplo, el grupo de incompatibilidad. En Chile no existen antecedentes de los tipos de plásmidos que albergan el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>, por lo que se plantea la siguiente hipótesis:

En cepas de enterobacterias de diferentes especies aisladas en hospitales chilenos, el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> se localiza en variantes de plásmidos de un mismo grupo de incompatibilidad.

## 1.7 Objetivo General

Identificar el grupo de incompatibilidad de los plásmidos en los cuales está localizado el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> en cepas de enterobacterias aisladas en hospitales chilenos.

## 1.8 Objetivos Específicos

1. Identificar el o los plásmidos en los que se localiza el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> en cepas de enterobacterias aisladas en Chile.
2. Determinar el grupo de incompatibilidad de los plásmidos portadores de *bla*<sub>KPC-2</sub>.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Cepas bacterianas.

Se trabajó con 8 cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasa KPC-2 aisladas en diferentes centros hospitalarios chilenos entre los años 2012 y 2014. Estos aislados fueron proporcionados, gentilmente, por el Instituto de Salud Pública de Chile.

Las cepas fueron seleccionadas de acuerdo a la especie bacteriana y, en el caso de las cepas de *K. pneumoniae* de acuerdo al secuenciotipo y ambiente genético en que se encuentra el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> (Tabla 1). Se utilizó las cepas *E. coli* K-12 (UC36), *E. coli* J53 (UC39), *E. coli* TG2 (UC54) y *E. coli* V517 (UC167) como controles positivos para la determinación de grupos de incompatibilidad y de tamaño molecular de diferentes plásmidos descritos en enterobacterias (Tabla 2). La cepa *E. coli* K-12 (UC 132) se utilizó como control negativo en el estudio de plásmidos y las cepas de *K. pneumoniae* KPC-2 (UC 293) y *P. aeruginosa* (UC 345), como controles positivos para el gen *bla*<sub>KPC</sub>. Las cepas se conservaron a -80 °C en una mezcla en proporción 2:1 de cultivo de 18-24 h en caldo tripticasa y glicerol 50 %.

**Tabla 1.** Características genéticas de enterobacterias productoras de enzima KPC-2 de diferentes centros de salud chilenos.

Cepa	Fecha aislamiento	ST	Ambiente genético
<i>K. pneumoniae</i> UC318	2012	ST101	Tn4401a
<i>K. pneumoniae</i> UC326	2012	ST11	Variante 1a Argentina
<i>E. coli</i> UC327	2012	ND	Variante 1a Argentina
<i>K. pneumoniae</i> UC329	2012	ST258	Tn4401a
<i>K. pneumoniae</i> UC338	2013	ST1161	Variante 1a Argentina
<i>K. oxytoca</i> UC344	2013	ST 140	Variante 1a Argentina
<i>S. marcescens</i> UC346	2014	ND	ND
<i>E. cloacae</i> UC347	2014	ND	ND

Fuente: Información otorgada por el ISP e información modificada de Barría-Loaiza C *et al.*, 2016.

**Tabla 2.** Cepas bacterianas utilizadas como controles para el análisis de plásmidos de grupos de incompatibilidad representativos en enterobacterias.

Cepa	Plásmido	Grupo Inc
<i>E. coli</i> (UC36)	pBR322	X, FIB, Frep
<i>E. coli</i> K-12 (UC37)	pBROC442	Frep
<i>E. coli</i> J53 (UC39)	RP4	P
<i>E. coli</i> TG2 (UC54)	pWH1266	FIB, Frep
<i>E. coli</i> V517 (UC167)	V517	FIIA, FIB, Frep, A/C, X

Inc: grupo de incompatibilidad.

Fuente: Elaboración propia.

## 2.2 Extracción de ADN total.

Cada cepa bacteriana fue sembrada en 10 mL de caldo tripticasa con una concentración subinhibitoria de ertapenem (16 µg/mL) - e incubada a 37°C durante 18 h. La extracción de ADN total se realizó por el método de lavado con NaCl 0,8%. Se centrifugó 1 mL de cultivo durante 5 min a 14.000 rpm, y se descartó el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en 0,5 mL de NaCl 0,8%, agitando en vortex a máxima velocidad, se centrifugó por 5 min a 14.000 rpm, se descartó el sobrenadante, y se repitió tres veces el mismo proceso de lavado. Luego el sedimento fue resuspendido nuevamente en 600 µL de agua libre de nucleasas y se sometió a ebullición en baño María por 12 min, para luego centrifugar. El sobrenadante se alicuotó y guardó a -20°C para ser utilizado como templado.

## 2.3 Determinación de grupos de incompatibilidad de plásmidos.

Previo a investigar el grupo de incompatibilidad, específicamente del plásmido portador del gen *bla<sub>KPC</sub>*, se realizó un *screening* de los grupos de incompatibilidad presentes en cada cepa, empleando ADN total. La metodología empleada fue la descrita por Carattoli *et al.* (2005) que utiliza PCR simples y PCR múltiple. Los partidores, tamaño de amplicon, número de acceso EMBL y sitio blanco se muestran en Tabla 3 y Tabla 4.

**Tabla 3.** Partidores utilizados para determinación de grupos de incompatibilidad mediante PCR simple.

<b>Partidor</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Sitio Blanco</b>	<b>N° acceso EMBL</b>	<b>Amplicon (pb)</b>
FrepB FW	5´-tgatcgtttaaggaatttg-3´	RNAI/repA	AY234375	270
FrepB RV	5´-gaagatcagtcacaccatcc-3´			
K/B FW	5´-gcggtccggaagccagaaaac-3´	RNAI	M93063	160
K RV	5´-tcttcacgagcccgcctaaa-3´			
B/O RV	5´-tctgcttccgccaagtcca-3´	RNAI	M28718	159

Fuente: Carattoli *et al.* J Microbiol Methods 2005. (63): Pag. 221

Este método identifica los grupos de incompatibilidad representativos de los principales plásmidos encontrados en *Enterobacteriaceae*. El método consiste en la amplificación de las secuencias codificantes relacionadas con el mecanismo de replicación de la estructura del plásmido y utiliza 3 PCR simples y 5 PCR múltiples, empleando los partidores que se muestran en las Tablas 3 y Tabla 4, respectivamente. Las características de las cepas que fueron empleadas como control se muestran en la Tabla 2.

El programa de amplificación consistió en un ciclo de 94°C por 5 min; seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 60 °C (PCR múltiple) y 52°C (PCR simple) por 30 s y 72°C por 1 min y, finalmente, una extensión final de 72 °C por 5 min.



### **2.3.1 Electroforesis de productos PCR**

Luego de someter a electroforesis en gel de agarosa 2% (*Invitrogen, ultra pure*), en búfer TAE (0,5X) a 100 V por 40 min, el gel fue teñido por 30 minutos con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Los productos de amplificación se visualizaron en transiluminador UV (Vilbert-Loumart), para luego ser fotografiados con el sistema de captura de imagen Kodak Digital Science DC120. El marcador de tamaño molecular utilizado correspondió a 1 Kb DNA Ladder plus y 100 pb DNA Ladder (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc*).

## **2.4 Estudio de perfil plasmídico**

### **2.4.1 Extracción de ADN plasmídico.**

Las cepas fueron sembradas en caldo Luria Bertani por 18 hrs, el cultivo se sometió a 3 lavados con NaCl 0,8%, como se describió anteriormente. Luego de los lavados, el sedimento fue resuspendido en 600 µL de agua libre de nucleasas, se traspasó a un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL y se procedió a la extracción del ADN plasmídico con el kit *DNA Zyppy Plasmid Miniprep* (*Zymo Research, N° catálogo D4036*), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se almacenó en alícuotas a -20 °C.

**Tabla 4.** Partidores utilizados para la determinación de grupos de incompatibilidad mediante PCR múltiple.

Nombre (Inc)	Secuencia	Sitio Blanco	N° acceso EMBL	Tamaño amplicon (pb)
HI1 FW	5'-ggagcgatggattacttcagtac-3'	parA-parB	AF250878	471
HI1 RV	5'-tgccgtttcacctcgtgagta-3'			
HI2 FW	5'-tttctcctgagtcacctgttaacac-3'	Iterons	BX664015	644
HI2 RV	5'-ggctcactaccgttgcatcct-3'			
I1 FW	5'-cgaaagccggacggcagaa-3'	RNAI	M20413	139
I1 RV	5'-tcgtcgttccgccaagttcgt-3'			
X FW	5'-aaccttagaggctatttaagttgctgat-3'	ori $\gamma$	Y00768	376
X RV	5'-tgagagtcaattttatctcatgttttagc-3'			
L/M FW	5'-ggatgaaaactatcagcatctgaag-3'	repA,B,C	U27345	785
L/M RV	5'-ctgcagggcgattcttagg-3'			
N FW	5'-gtctaacgagcttaccgaag-3'	repA	NC_003292	559
N RV	5'-gtttcaactctgccaagttc-3'			
FIB FW	5'-ggagttctgacacacgattttctg-3'	repA	M26308	702
FIB RV	5'-ctcccgtcgttcagggcatt-3'			
W FW	5'-cctaagaacaacaagcccccg-3'	repA	U12441	242
W RV	5'-ggtgcgcgcatagaaccgt-3'			
Y FW	5'-aattcaaacaacactgtgcagcctg-3'	repA	K02380	765
Y RV	5'-gcgagaatggacgattacaaaacttt-3'			
P FW	5'-ctatggccctgcaaacgcgcagaaaa-3'	Iterons	M20134	534
P RV	5'-tcacgcgccagggcgcagcc-3'			
FIC FW	5'-gtgaactggcagatgaggaagg-3'	repA2	AH003523	262
FIC RV	5'-ttctcctcgtcgccaaactagat-3'			
A/C FW	5'-gagaaccaagacaagacctgga-3'	repA	X73674	465
A/C RV	5'-acgacaaacctgaattgcctcctt-3'			
T FW	5'-ttggcctgtttgtgcctaaaccat-3'	repA	K00053	750
T RV	5'-cgttgattacacttagctttggac-3'			

Fuente: Carattoli *et al.* J Microbiol Methods 2005. (63): Pag. 221

#### **2.4.2 Electroforesis en gel de agarosa**

Se cargó 10 µL de ADN plasmídico con 7,5 µL de búfer de carga en un gel de agarosa al 0,8 % en búfer TAE 0,5X y se realizó electroforesis a 25 V por 15 h con búfer TAE 0,5X. El gel fue teñido por 30 min con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y visualizado en transiluminador UV. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa UVI-1D de UVITEC (UVITEC Cambridge), para escalar los tamaños aproximados (ca.) de las diferentes bandas de ADN plasmídico. Se utilizó como marcador estándar de tamaño de plásmidos la cepa *E. coli* V517 (UC167) (Wang *et al.*, 2014).

#### **2.5. Detección de plásmido portador de gen *bla*<sub>KPC-2</sub>**

Para determinar el plásmido en que estaba localizado el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>, se utilizó hibridación por *Southern Blot* (Sambrook *et al.*, 1989), con sonda elaborada a partir de producto de PCR y posteriormente marcada.

Se transfirió el ADN desde gel de agarosa a una membrana de nylon cargada positivamente (Amersham Hybond™-XL), para posteriormente hibridar con la sonda específica para el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>. La transferencia se realizó por capilaridad con solución de transferencia que al pasar a través del gel, arrastra el ADN hasta la membrana. La transferencia y desnaturalización fue de tipo alcalina, siguiendo el protocolo de Sambrook *et al.* (1989).

##### **2.5.1 Construcción de la sonda.**

Para la fabricación de la sonda, se realizó PCR con el objetivo de amplificar un fragmento del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> empleando los partidores descritos por Queenan y Bush (2007): KPC-FW (ATGTCACTGTATCGCCGTCT) y KPC-RV (TTTTCAGAGCCTTACTGCCC), los cuales producen un amplicon de 893 pb. Posterior al PCR, se realizó la visualización del producto de amplificación y la sonda fue marcada con *DIG High Prime DNA Labeling and Detection starter Kit I*,

(Laboratorios Roche, n° catálogo 11585614910), siguiendo las indicaciones del fabricante. La hibridación con la sonda se realizó a las temperaturas de 43°C, 45°C y 49°C.

### **2.5.2 Extracción de banda de ADN plasmídico hibridado con gen *bla*<sub>KPC</sub> desde gel de agarosa y determinación del grupo de incompatibilidad.**

Luego de la visualización del fragmento hibridado con la sonda *bla*<sub>KPC-2</sub>, se realizó el corte del fragmento correspondiente y se purificó con el kit *Wizard<sup>®</sup> SV Gel & PCR Clean-up System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADNp extraído fue utilizado posteriormente para el análisis del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> mediante PCR, y confirmar que la banda de ADN aislada portaba este gen; y para determinar el grupo de incompatibilidad por PCR como se describió previamente (Carattoli *et al.*, 2005). Además, se realizó amplificación del gen que codifica para ADNr 16S para verificar la ausencia de contaminación con ADN cromosomal.

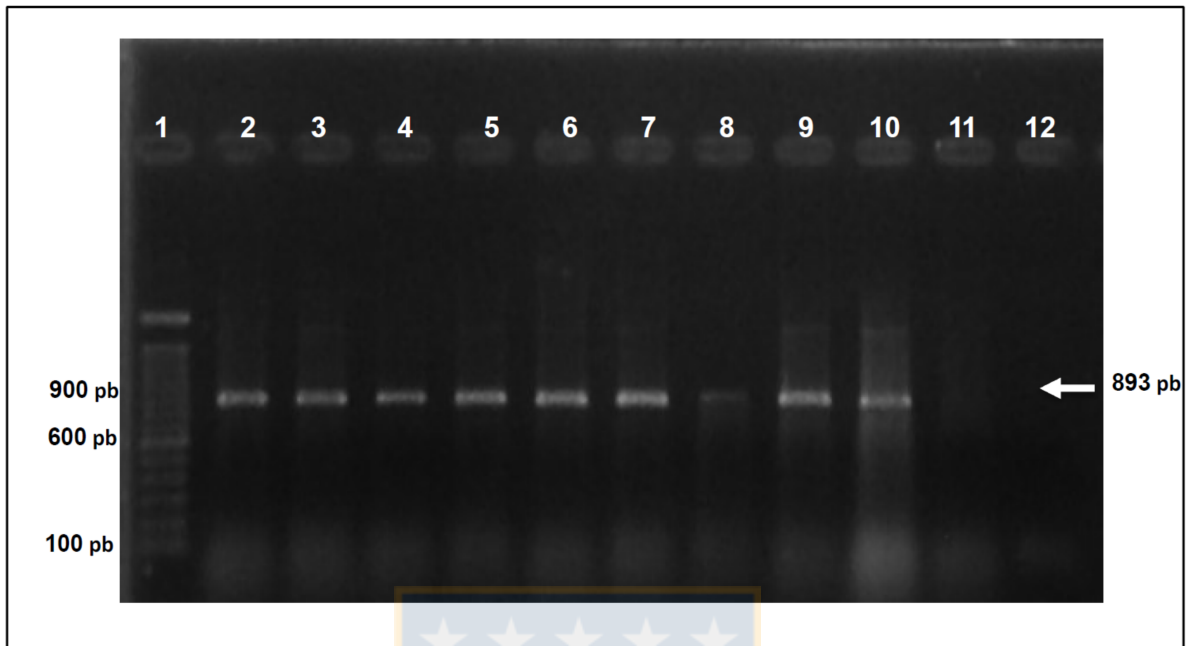
### **2.6 Secuenciación de replicón.**

Los productos de PCR del análisis de los grupos de incompatibilidad realizados a los plásmidos portadores del gen *bla*<sub>KPC</sub>, fueron enviados a secuenciar a MacroGen (Korea), para la confirmación del grupo de incompatibilidad. Se realizó alineamiento de la secuencia obtenida con secuencias del grupo Inc de los plásmidos pertenecientes a un mismo grupo de incompatibilidad entre las diferentes cepas estudio, y determinar la existencia de variantes por sustituciones en sus secuencias o si eran conservadas respecto a plásmido de referencia (Carattoli *et al.*, 2006). El análisis de las secuencias se realizó mediante BLAST, con el programa Geneious Basic 5.5.7, 2012 (Biomatters Ltd.).

### 3. RESULTADOS

El trabajo fue iniciado con la determinación por PCR de la presencia del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> en las cepas de enterobacterias seleccionadas para el estudio. En la Figura 3 se muestran los resultados de la presencia del gen codificante para la carbapenemasa tipo KPC-2 en las cepas productoras de esta enzima con la obtención del amplicon de 893 pb esperado.

Al investigar los grupos de incompatibilidad de los plásmidos contenidos en las cepas de enterobacterias portadoras del gen de resistencia a carbapenémicos *bla*<sub>KPC</sub> se encontró que las 8 cepas estudiadas poseían una variedad de plásmidos con diferentes replicones, con la mayoría correspondiente a los grupos de incompatibilidad F (Tabla 5). Así, en las cepas de *K. pneumoniae* UC318 y UC329 y la cepa de *K. oxytoca* UC344 se evidenció la presencia de plásmidos de dos grupos de incompatibilidad, IncFIIA e IncX en ambas cepas de *K. pneumoniae* y los grupos IncFrep e IncA/C en la cepa de *K. oxytoca* UC344. Tres grupos de incompatibilidad fueron determinados para los plásmidos de las cepas de *K. pneumoniae* UC326 y UC338 (IncFrep, IncA/C e IncX) y 3 en la cepa de *E. cloacae* UC347 (IncFIB, IncN e IncHI2). En la cepa de *E. coli* UC327 se encontraron grupos Inc (IncFIB, IncY, IncN e IncA/C). La cepa de *S. marcescens* UC346 fue la única en la que no se pudo determinar el grupo de incompatibilidad por el método de Carattoli *et al.* (2005).



Fuente: Elaboración propia.

**Figura 3.** Análisis producto de PCR del gen *bla<sub>KPC</sub>* (893 pb) en cepas de enterobacterias productoras de KPC-2 aisladas en diferentes centros hospitalarios chilenos. Carril 1. 100 pb DNA Ladder; carril 2. *K. pneumoniae* UC318; carril 3. *K. pneumoniae* UC326; carril 4. *E. coli* UC327; carril 5. *K. pneumoniae* UC329; carril 6. *K. pneumoniae* UC338; carril 7. *K. oxytoca* UC344; carril 8. *S. marcescens* UC346; carril 9. *E. cloacae* UC347; carril 10. *K. pneumoniae* UC293 (control positivo gen *bla<sub>KPC</sub>*); carril 11. *E. coli* V517 (control negativo *bla<sub>KPC-2</sub>*); carril 12. Control mezcla de reacción.

**Tabla 5.** Grupos de incompatibilidad de plásmidos en cepas de enterobacterias productoras de enzima KPC-2 aisladas en centros de salud chilenos.

Cepa	Grupo Inc
<i>K. pneumoniae</i> UC318	FIIA, Frep, X
<i>K. pneumoniae</i> UC326	Frep, A/C, X
<i>E. coli</i> UC327	FIB, Frep, Y, A/C, N
<i>K. pneumoniae</i> UC 329	FIIA, X
<i>K. pneumoniae</i> UC338	A/C, X, Frep
<i>K. oxytoca</i> UC344	Frep, A/C
<i>S. marcescens</i> UC346	NT
<i>E. cloacae</i> UC347	HI2, N, FIB, Frep

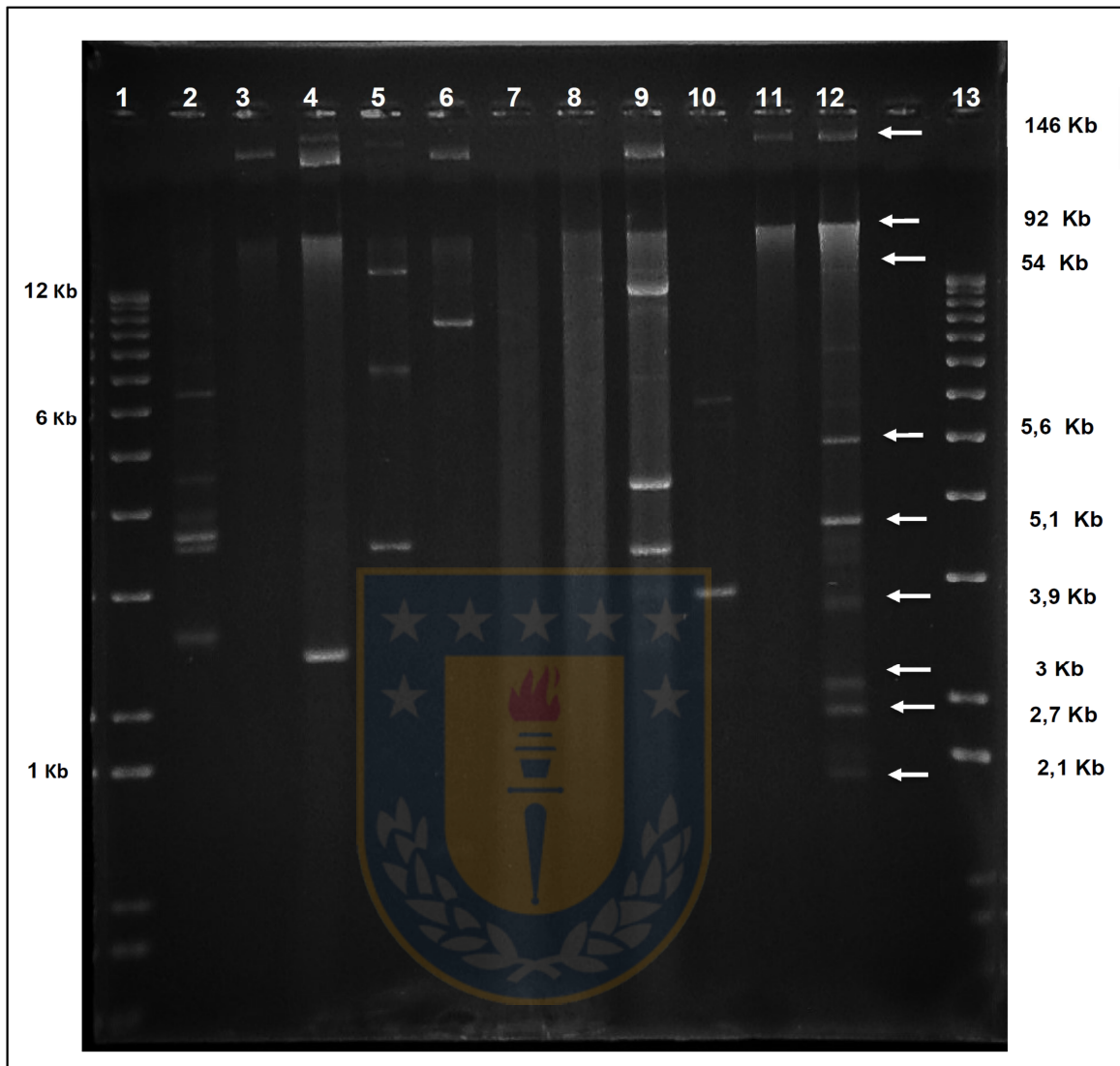
Fuente: Elaboración propia.

NT: no tipificable por método de Carattoli *et al.* (2005).

Inc: grupo de incompatibilidad.

### 3.1 Estudio de perfil plasmídico.

En la Figura 4 se puede observar que las cepas mostraron más de una banda de ADN plasmidial. Al realizar escalamiento con el programa UVI-1D (UVITEC), usando la cepa *E. coli* V517 como marcador de tamaño, se determinó un rango de tamaño aproximado de las bandas de ADN plasmidial que osciló entre 2 Kb, en la cepa *K. pneumoniae* UC338, y 169 Kb en la cepa *E. coli* UC327 (Tabla 6).



Fuente: Elaboración propia.

**Figura 4.** Perfil plasmídico de cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasa KPC-2 aisladas en hospitales chilenos. Carriles 1 y 13. Marcador tamaño molecular 1 Kb plus DNA Ladder; carril 2. *K. pneumoniae* UC318; carril 3. *K. pneumoniae* UC326; carril 4. *E. coli* UC327; carril 5. *K. pneumoniae* UC329; carril 6. *K. pneumoniae* UC338; carril 7. *K. oxytoca* UC344; carril 8. *S. marcescens* UC346; carril 9. *E. cloacae* UC347; carril 10. *E. coli* UC36; carril 11. *E. coli* UC39; carril 12. *E. coli* V517.



**Tabla 6.** Tamaño aproximado (ca.) de las bandas de ADN plasmidial de cepas de enterobacterias productoras de KPC-2.

Cepa	Tamaño bandas plasmídicas (ca. Kb)
<i>K. pneumoniae</i> UC318	107
	56
	6
<i>K. pneumoniae</i> UC 326	146
	92
<i>E. coli</i> UC 327	169
	146
	92
	4
<i>K. pneumoniae</i> UC 329	103
	6
<i>K. pneumoniae</i> UC 338	146
	92
	85
	2
<i>K. oxytoca</i> UC 344	146
	92
	3
<i>S. marcescens</i> UC 346	96
	146
<i>E. cloacae</i> UC 347	92
	54
	45
	6
	5

Fuente: Elaboración propia.

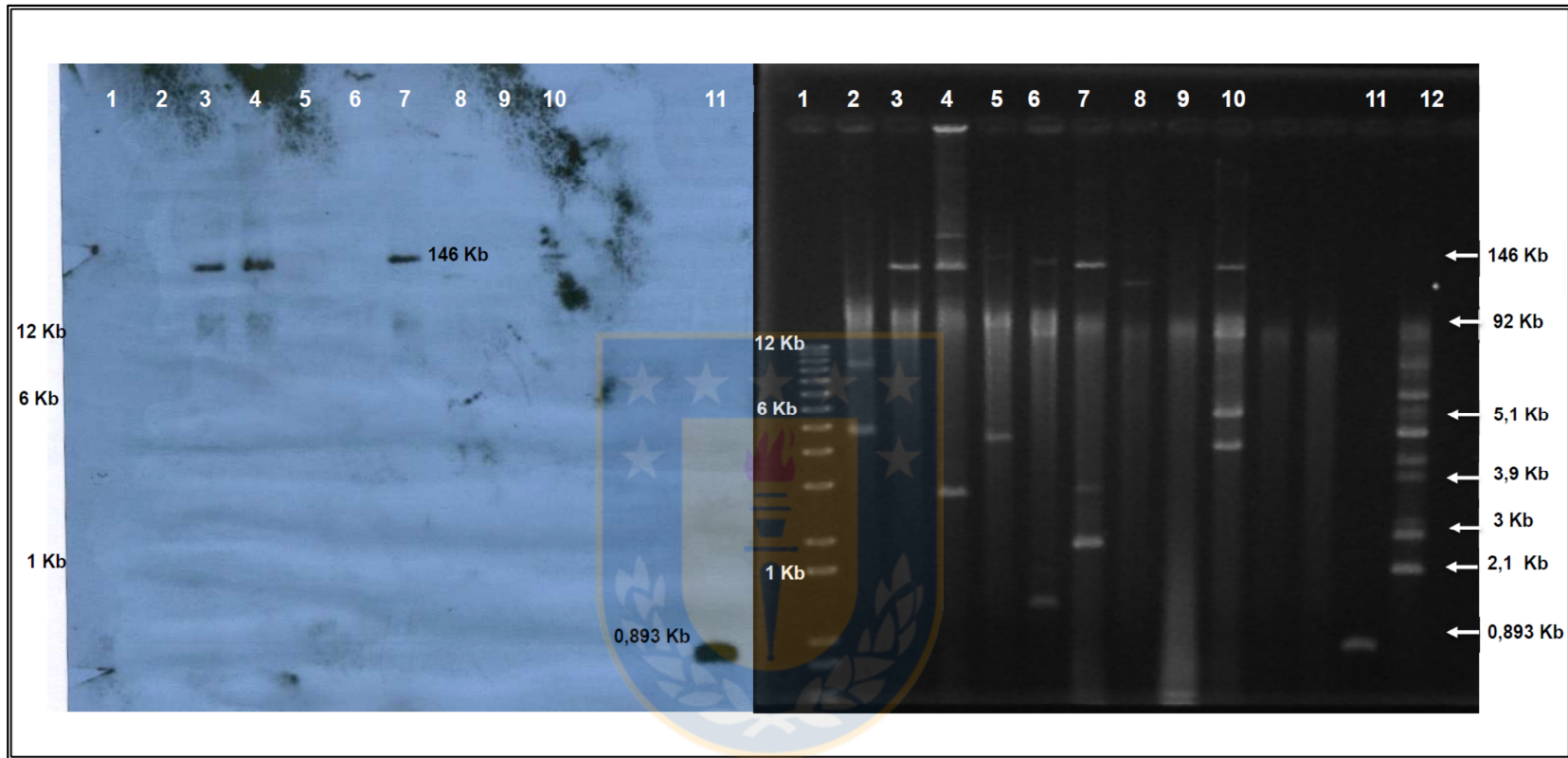
### 3.2 Southern Blot.

Para el proceso de hibridación entre la sonda *bla*<sub>KPC</sub> de 893 pb y el ADN plasmidial se emplearon tres temperaturas: 43°C, 45°C y 49°C, para comparar si existían diferencias en los híbridos resultantes en las membranas o si se formaban híbridos inespecíficos.

En la Figura 5 se muestra la hibridación a 43°C. La sonda *bla*<sub>KPC-2</sub> hibridó con una banda de ADN plasmidial de tamaño aproximado de 146 Kb presente en las cepas *K. pneumoniae* UC326, *E. coli* UC327 (146pECO), *K. oxytoca* UC344 (146pKOX), *E. cloacae* UC347 (146pECL). Se puede observar hibridación con el ADN control del gen en estudio y no presentó hibridación inespecífica.

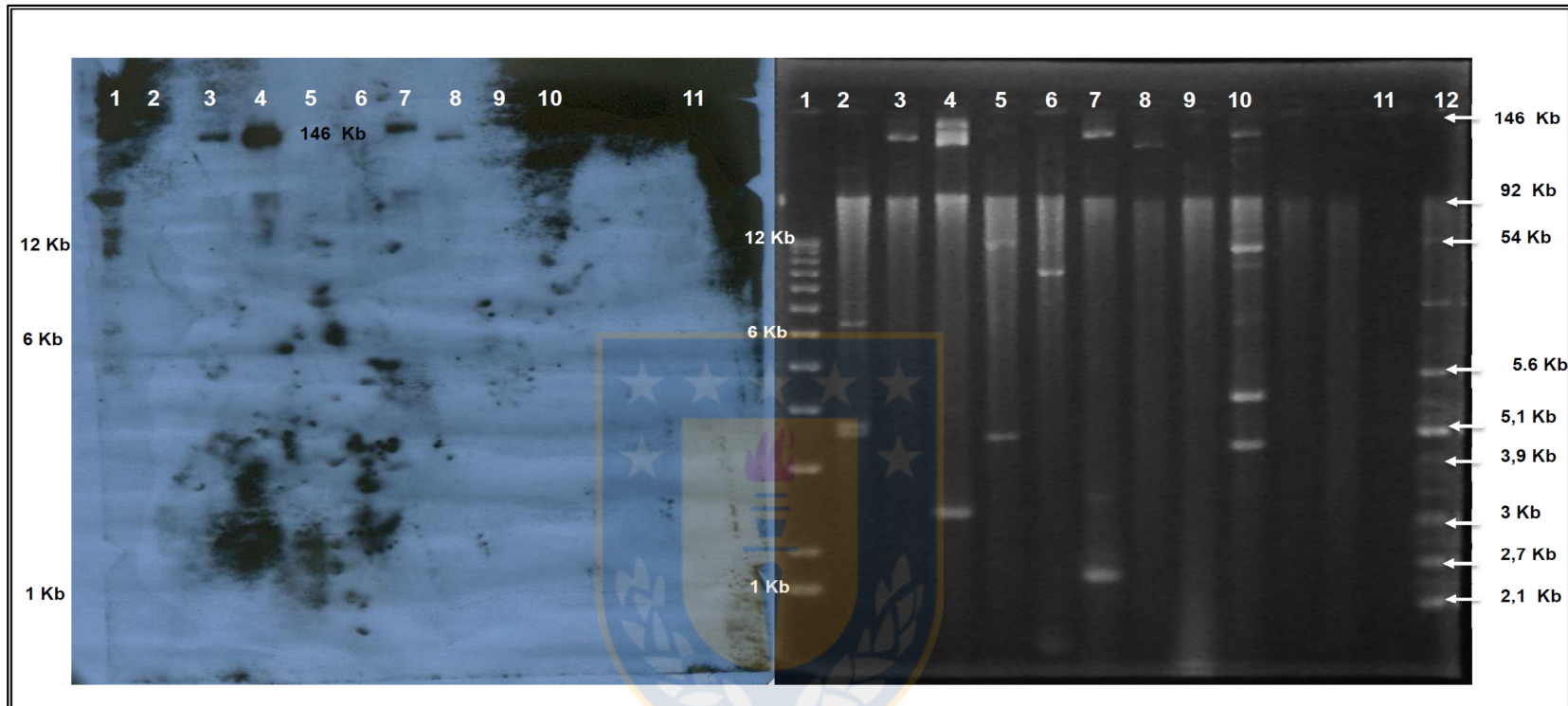
La Figura 6 muestra la hibridación realizada a 45°C, la sonda hibridó con una banda de ADN de tamaño aproximado de 146 Kb, como en la membrana hibridada a 43°C, en las cepas *K. pneumoniae* UC326, *E. coli* UC327 (146pECO), *K. oxytoca* UC344 (146pKOX), pero no en la cepa *E. cloacae* UC347 (146pECL) como se obtuvo a 43 °C. Se pudo observar que la sonda no hibridó de manera inespecífica.

En la Figura 7 se muestra la hibridación realizada a 49°C, la sonda hibridó con dos bandas de ADN plasmidial de ca.146 Kb y 92 Kb en las cepas *K. pneumoniae* UC326, *E. coli* UC327 (146pECO y 92pECO respectivamente), *K. pneumoniae* UC338 (146pKPN y 92pKPN), *K. oxytoca* UC344 (146pKOX y 92pKOX) y *E. cloacae* UC347 (146pECL y 92pECL). Se pudo observar que a esta temperatura la sonda no hibridó de manera inespecífica, ya que no se detectó señal o híbrido con ADN plasmídico de cepas no portadoras del gen *bla*<sub>KPC</sub>. A diferencia de lo que se reveló en los dos films anteriores (Figuras 6 y 7), a 49°C se pudo detectar dos bandas de ADN que portaban el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>, pero no se podía establecer si las dos bandas presentes en cada cepa correspondían a diferentes conformaciones de un mismo plásmido hasta este punto del estudio.



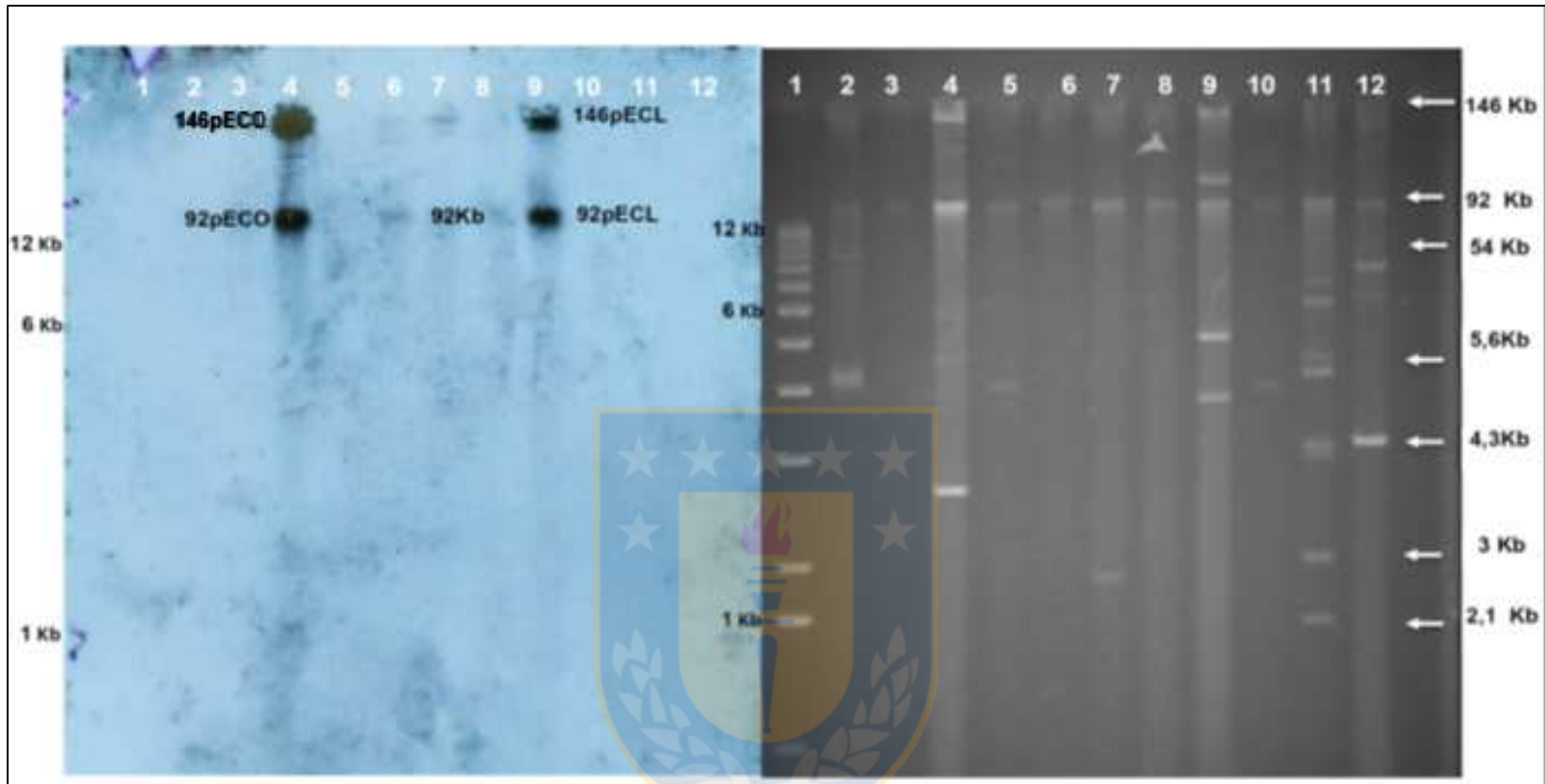
Fuente: Elaboración propia.

**Figura 5.** Film y perfil plasmídico de cepas de enterobacterias portadoras de gen  $bla_{KPC-2}$  y análisis por *Southern blot* de ADN plasmidial a 43°C. Carril 1. 1 Kb plus DNA Ladder; carril 2. *K. pneumoniae* UC318; carril 3. *K. pneumoniae* UC326; carril 4. *E. coli* UC327; carril 5. *K. pneumoniae* UC329; carril 6. *K. pneumoniae* UC338; carril 7. *K. oxytoca* UC344; carril 8. *P. aeruginosa* UC345 (plásmido  $bla_{KPC}$ ); carril 9. *S. marcescens* UC346; carril 10. *E. cloacae* UC347; carril 11. *K. pneumoniae* UC293 (control  $bla_{KPC}$  positivo); carril 12. *E. coli* V517.



Fuente: Elaboración propia.

**Figura 6.** Film y perfil plasmídico de cepas de enterobacterias portadoras de gen  $bla_{KPC-2}$  y análisis por *Southern blot* de ADN plasmidial a 45°C. Carril 1. 1 Kb plus DNA Ladder; carril 2. *K. pneumoniae* UC318; carril 3. *K. pneumoniae* UC326; carril 4. *E. coli* UC327; carril 5. *K. pneumoniae* UC329; carril 6. *K. pneumoniae* UC338; carril 7. *K. oxytoca* UC344; carril 8. *P. aeruginosa* UC 345 (plásmido  $bla_{KPC}$ ); carril 9. *S. marcescens* UC346; carril 10. *E. cloacae* UC347; carril 11. *K. pneumoniae* UC293 (control  $bla_{KPC}$  positivo); carril 12. *E. coli* V517.



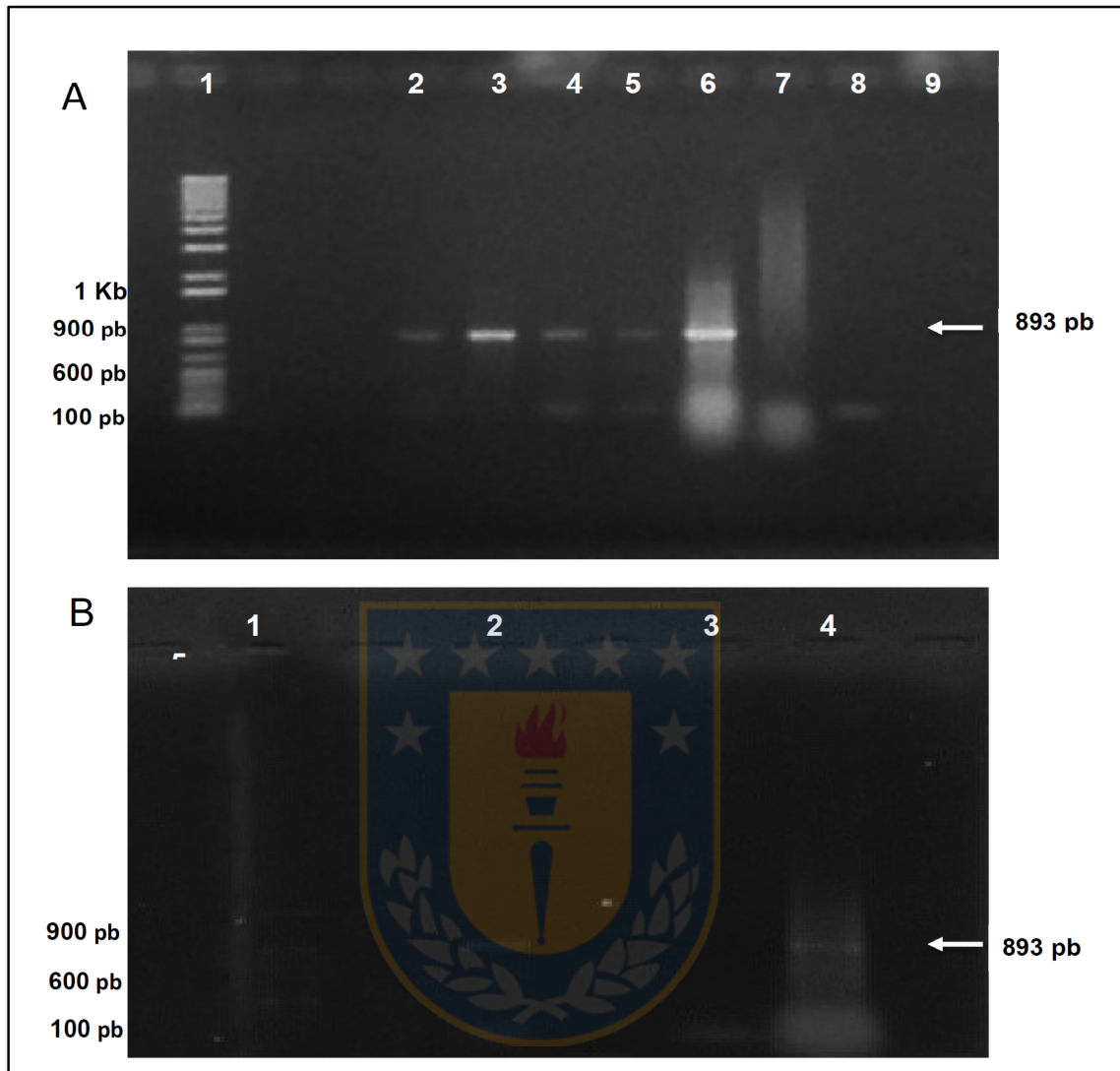
Fuente: Elaboración propia.

**Figura 7.** Film y perfil plasmídico de cepas de enterobacterias portadoras de gen *bla*<sub>KPC-2</sub> y análisis por *Southern blot* de ADN plasmidial a 49°C. Carril: 1. 1 Kb plus DNA Ladder; carril 2. *K. pneumoniae* UC318; carril 3. *K. pneumoniae* UC326; carril 4. *E. coli* UC327; carril 5. *K. pneumoniae* UC329; carril 6. *K. pneumoniae* UC338; carril 7. *K. oxytoca* UC344; carril 8. *S. marcescens* UC346; carril 9. *E. cloacae* UC347; carril 10. *K. pneumoniae* UC293 (plásmido *bla*<sub>KPC-2</sub>); carril 11. *E. coli* V517; carril 12. *E. coli* UC36 (control *bla*<sub>KPC-2</sub> negativo).

### 3.3 Determinación de grupos de incompatibilidad del plásmido portador del gen *bla*<sub>KPC</sub>.

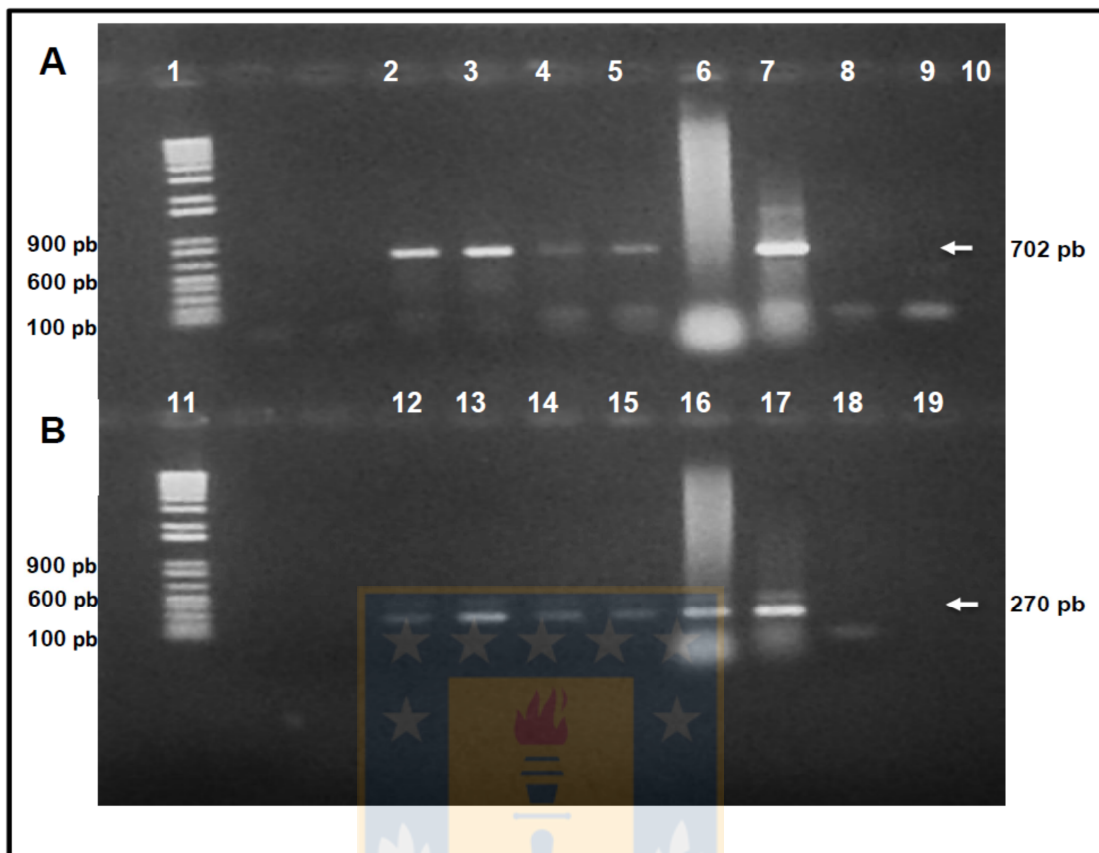
Luego de la extracción del ADN desde las bandas de ADN plasmidial que formaron híbrido con la sonda, se comprobó la presencia del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> en cada uno y, además, el grupo de incompatibilidad al que pertenecían. Mediante PCR, se pudo determinar que el ADN extraído de todas las bandas presentaba el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>, por lo que el híbrido de ca. 92 Kb detectado en la membrana hibridada a 49°C no correspondía a hibridación inespecífica de la sonda. En la Figura 8 se muestra el resultado para las cepas *E. coli* UC327 y *E. cloacae* UC347. Al identificar el grupo de incompatibilidad de los plásmidos aislados (Inc) se encontró que las dos bandas de ADN plasmidial de las cepas *E. coli* UC 327 y *E. cloacae* UC 347 amplificaron para el gen de Inc FIB (702 pb, gen proteína repA) (Figura 9 **(A)**), lo que fue confirmado con la amplificación para el gen Inc Frep (270 pb) (Figura 9 **(B)**). Estos partidores detectan 26 variantes representativas del grupo IncF en plásmidos de enterobacterias (Carattoli *et al.*, 2005).

Debido a que las dos bandas de ADN plasmidial detectadas en cada cepa pertenecían a un mismo grupo Inc, se pudo inferir que ambas bandas de ADN plasmidial correspondían a diferentes conformaciones del mismo plásmido. En el ADN plasmídico purificado donde se identificó el gen correspondiente al grupo Inc FIB en la cepa *E. coli* UC327 también se obtuvo amplificación para el grupo de incompatibilidad N. Debido a este hallazgo, se pudo establecer que ambas bandas de ADN plasmidial aisladas en las cepas de *E. coli* UC327, *K. pneumoniae* UC338, *K. oxytoca* UC344 y *E. cloacae* UC347, correspondían a un único plásmido, pero presente en diferente conformación, en cada una de estas cepas.



Fuente: Elaboración propia.

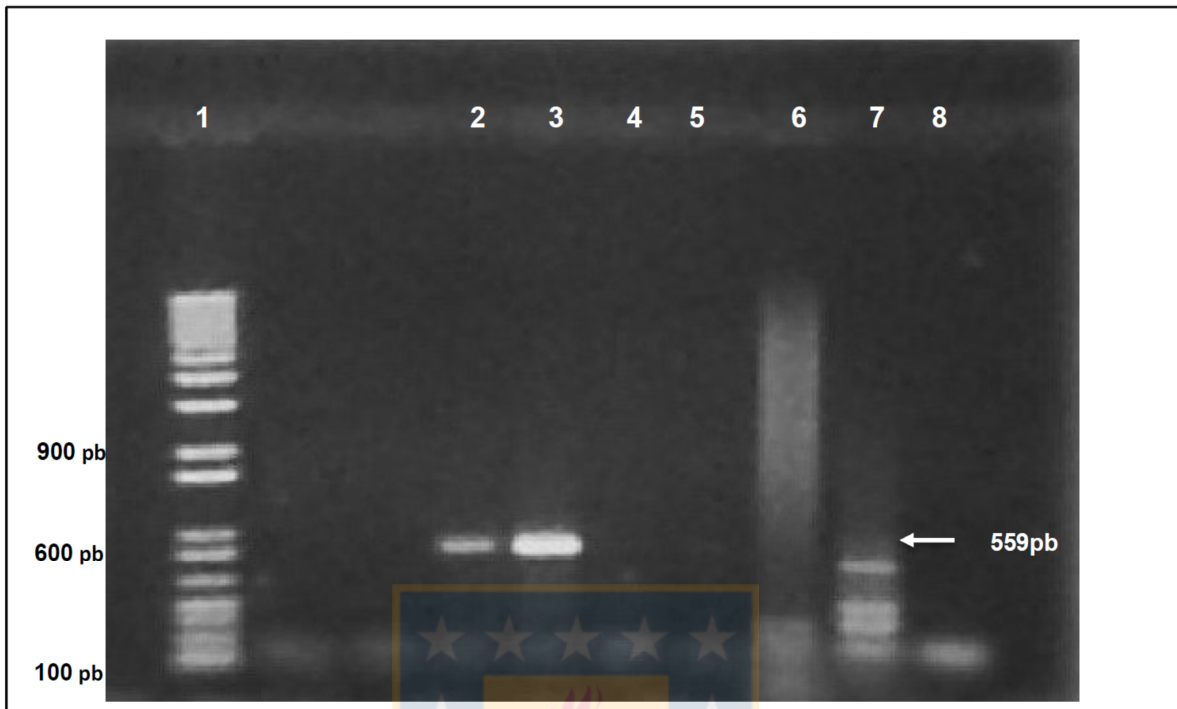
**Figura 8.** Análisis producto de PCR del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> en ADN plasmidial purificado desde gel de agarosa. **(A)** Carril 1. 1 Kb plus DNA Ladder; carril 2. *E. coli* UC327 146pECO (ca. 146 Kb); carril 3. *E. coli* UC327 92pECO (ca. 92 Kb); carril 4. *E. cloacae* UC347 92pECL (ca. 92 Kb); carril 5. *E. cloacae* UC347 146pECL (ca. 146 Kb); carril 6. *K. pneumoniae* UC 293 (control positivo *bla*<sub>KPC-2</sub>); carril 7. *E. coli* V517; carril 8. *E. coli* UC132 (control negativo *bla*<sub>KPC-2</sub>); carril 9. Control mezcla de reacción. **(B)** Carril 1. 1 Kb DNA Ladder; carril 2. *K. oxytoca* UC344 146pKOX (146 Kb); carril 3. *K. oxytoca* UC344 92pKOX (92 Kb); carril 4. *K. pneumoniae* UC293 (control positivo *bla*<sub>KPC-2</sub>); carril 5. Control mezcla de reacción.



Fuente: Elaboración propia.

**Figura 9.** Análisis producto de PCR de los grupos de incompatibilidad IncFIB e IncFrep en plásmidos portadores del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> de cepas de enterobacterias aisladas en hospitales chilenos. **(A)** FIB (702 pb): Carril 1. 1 Kb plus DNA Ladder; carril 2. *E. coli* UC327 146pECO (146Kb); carril 3. *E. coli* UC327 92pECO (92Kb); carril 4. *E. cloacae* UC34792pECL (92Kb); carril 5. *E. cloacae* UC347 146pECL (146Kb); carril 6. *E. coli* UC 36 ; carril 7. *E. coli* V517 (control positivo Inc FIB); carril 8. *E. coli* UC 132 (control negativo IncFIB); carril 9. *K. pneumoniae* UC 293 (control negativo IncFIB); carril 10. Control mezcla de reacción. **(B)** Frep (270 pb). Carril 11. 1 Kb plus DNA Ladder; carril 12. *E. coli* UC327 146pECO (146Kb); carril 13. *E. coli* UC327 92pECO (92Kb); carril 14. *E. cloacae* UC347 92pECL (92Kb) ; carril 15. *E. cloacae* UC347 146pECL (146Kb); carril 16. *E. coli* UC36 (control positivo Inc Frep); carril 17. *E. coli* V517 (control positivo Inc Frep); carril 18. *E. coli* UC 132 (control negativo IncFrep); carril 19. Control mezcla de reacción.





Fuente: Elaboración propia.

**Figura 10.** Análisis producto de PCR de los grupos de incompatibilidad IncN en plásmidos portadores del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> de cepas de enterobacterias aisladas en hospitales chilenos. Carril 1. 1 Kb plus DNA Ladder; carril 2. *E. coli* UC327 146pECO (146Kb); carril 3. *E. coli* UC327 92pECO (92Kb); carril 4. *E. cloacae* UC347 92pECL (92Kb); carril 5. *E. cloacae* UC347 146pECL (146Kb); carril 6. *E. coli* UC 36 (control negativo IncN); carril 7. *E. coli* V517 (control negativo IncN); carril 8. Control mezcla de reacción.

En la Tabla 7 se presenta un resumen de los resultados. Se observa que se determinó el grupo de incompatibilidad específico en ADN plasmidial que portaba el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> en tres cepas: *E. coli* UC 327, *K. pneumoniae* UC 338 y *E. cloacae* UC 347. El gen de resistencia a carbapenémicos *bla*<sub>KPC</sub> también fue encontrado en ADN plasmídico en la cepa de *K. oxytoca* UC344, pero no se pudo tipificar el grupo de incompatibilidad por el método de Carattoli *et al.* (2005). Adicionalmente, fue posible establecer que el gen *bla*<sub>KPC</sub> está asociado a plásmidos del grupo de incompatibilidad

de las variantes pertenecientes a IncF, específicamente a la variante FIB en la cepas *E. coli* UC 327 y *E. cloacae* UC 347. En la cepa *K. pneumoniae* UC 338 sólo se pudo identificar que pertenecía grupo IncF, pero no a cuál variante específicamente. Adicionalmente, en la cepa *E. coli* UC 327, se identificó en 146pECO y 92pECO el replicón IncN (Figura 10), lo que puede deberse a que el mismo plásmido presenta dos replicones diferentes.

**Tabla 7.** Características de plásmidos portadores del gen *bla<sub>KPC-2</sub>* en cepas de enterobacterias aisladas en hospitales chilenos.

Cepa	Plásmido	Grupo Inc	Tamaño ca. (Kb)
<i>K. pneumoniae</i> UC 326	ND	ND	146
<i>E. coli</i> UC 327	146pECO	FIB, N	146
<i>K. pneumoniae</i> UC 338	146pKPN	Frep	146
<i>K. oxytoca</i> UC 344	146pKOX	NT	146
<i>S. marcescens</i> UC 346	ND	ND	92
<i>E. cloacae</i> UC 347	146pECL	FIB	146

Fuente: Elaboración propia.

Inc: grupo de incompatibilidad. ND: no determinado, NT: no tipificable por método de Carattoli *et al.* (2005).

### 3.4 Secuenciación de replicón.

Como las cepas de *E. coli* y *E. cloacae* presentaban plásmidos codificantes para carbapenemasa KPC-2 que pertenecían al mismo grupo de Incompatibilidad, IncFIB, los productos de PCR fueron secuenciados. La secuencia de ADN fue analizada por alineamiento por BLAST, mediante el programa computacional Geneious Basic 5.5.7. (Biomatters Ltd., 2012), y se determinó que correspondían al gen codificante para la proteína RepA en los dos casos.

Al realizar un alineamiento múltiple de las secuencias nucleotídicas del producto de PCR de IncFIB en Geneious, se evidenció que las secuencias de los plásmidos de la cepa *E. coli* UC327 (146pECO) y de la cepa *E. cloacae* UC347 (146pECL) portadores del gen *bla*<sub>KPC-2</sub>, presentaron alto porcentaje de identidad, ya que poseen 99,7% de identidad entre sí (Figura 11, Tabla 8). Al comparar las secuencias de ADN plasmidial de ca. 146 y 92 Kb de la cepa *E. cloacae* UC 347, estas secuencias presentaron dos o más sustituciones en comparación con las secuencias de ADN plasmidial de los mismos tamaños de la cepa *E. coli* UC327.

Al comparar las secuencias de ADN plasmidial de *E. coli* UC327 (146pECO), *K. pneumoniae* UC338 (146pKPN) y *E. cloacae* UC347 (146pECL) obtenidas con los oligonucleótidos para el grupo de incompatibilidad F (IncFrep), se encontró que las bandas entre sí presentaban un porcentaje de identidad sobre 80% (Figura 12, Tabla 9). Por lo anteriormente descrito se podría suponer que, aunque permanezca indeterminada la variante del grupo IncF del plásmido 146pKPN de la cepa *K. pneumoniae* UC388, este plásmido está estrechamente relacionado con los presentes en las cepas *E. coli* UC327 (146pECO) y *E. cloacae* UC347 (146pECL).



Fuente: Extraído de Geneious Basic 5.5.7. 2012. Biomatters Ltd.

**Figura 11.** Alineamiento de secuencias del grupo de incompatibilidad IncFIB (416 pb) de plásmidos portadores de *bla*<sub>KPC-2</sub>. Gris: mutaciones

	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	245          255          265          275          285          295
146pECO	GATCACCGGC CCCC GCCTGG ATATGGATAA TGATTTCAAG ACCTGGGTGG GGATCATTCA
92pECO	GATCACCGGC CCCC GCCTGG ATATGGATAA TGATTTCAAG ACCTGGGTGG GGATCATTCA
146pECL	CATCACCGGC CCCC GCCTGG ATATGGATAA TGATTTCAAG ACCTGGGTGG GGATCATTCA
92pECL	GATCACCGGC CCCC GCCTGG ATATGGATAA TGATTTCAAG ACCTGGGTGG GGATCATTCA
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	305          315          325          335          345          355
146pECO	TTCCTTTGCC CGCCATAACG TGATTGGTGA CAAAGTTGAA CTGCCTTTTG TTGAGTTTGC
92pECO	TTCCTTTGCC CGCCATAACG TGATTGGTGA CAAAGTTGAA CTGCCTTTTG TTGAGTTTGC
146pECL	TTCCTTTGCC CGCCATAACG TGATTGGTGA CAAAGTTGAA CTGCCTTTTG TTGAGTTTGC
92pECL	TTCCTTTGCC CGCCATAACG TGATTGGTGA CAAATTTGAA CTGCCTTTTG TTGAGTTTGC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	365          375          385          395          405          415
146pECO	AAA ACTGTGT GGTATACCTT CAAGCCAGTC ATCCCGCAGG CTGCGTGAGC GCATCA
92pECO	AAA ACTGTGT GGTATACCTT CAAGCCAGTC ATCCCGCAGG CTGCGTGAGC GCATCA
146pECL	AAA ACTGTGT GGAATACCTT CAAGCCAGTC ATCCCGCAGG CTGCGTGAGC GCATCA
92pECL	AAA ACTGTGT GTACACCTT CTCACCAGTC ATCCCGTACG CTGCGTGAGC GCATCA

Fuente: Extraído de Geneious Basic 5.5.7. 2012. Biomatters Ltd.

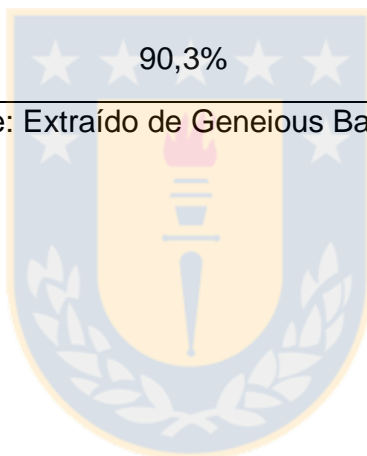
**Figura 11 (continuación).** Alineamiento de secuencias del grupo de incompatibilidad IncFIB (416 pb) de plásmidos portadores de *bla*<sub>KPC-2</sub>.

Gris: mutaciones.

**Tabla 8.** Porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de PCR del grupo de incompatibilidad FIB de los plásmidos portadores del gen *bla<sub>KPC-2</sub>* de las cepas *E. coli* UC327 y *E. cloacae* UC347.

<b>Amplicon FIB</b>	<b>146pECO</b>	<b>92pECO</b>	<b>146pECL</b>	<b>92pECL</b>
<b>146pECO</b>		100%	99,7%	90,3%
<b>92pECO</b>	100%		99,7%	90,3%
<b>146pECL</b>	99,7%	99,7%		90%
<b>92pECL</b>	90,3%	90,3%	90%	

Fuente: Extraído de Geneious Basic 5.5.7. 2012. Biomatters Ltd.



	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	5 15 25 35 45 55
146pECO	GTATTGAACT TTTCTGAGCA TAAAACTATA CTCCTGCAT AGAGCAACAG CTTT CTATAC
146pKPN	GTCTTGAAC TTTCCGGGCATATAACTATA CTCCTGCAT AGCTGAATTG CTCGCTATAC
146pECL	GTCTTGAAC TTTCCGGGCATATAACTATA CTCCTGCAT AGCTGAATTG TTGGCTATAC
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	65 75 85 95 105 115
146pECO	AGTTTAAGTA GGCCCCGTTA ATCTTCTTCT AGTCGCCAAA CCTGCTGAAG ATTATCGGGG
146pKPN	GGTTTAAGTG GGCCCCGGTA ATCTTCTCTT AGTCGCCTCA CCTGGTGAAT ATTATCGGGG
146pECL	GGTTTAAGTG GGCCCCGGTA ATCTTCTCTT AGTCGCCAAA CCTGGTGAAG ATTATCGGGG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	125 135 145 155 165 175
146pECO	TTTTTGCTTT TCTGGTCCCG GGTAGACACC TCATCAGAAC CAGTTCCTG CCACCTTACG
146pKPN	TTTTTGCTTT TCTGGCCTCC TGCAACCGCC ACATCATACC CAGTTCCTG CCACCTTACG
146pECL	TTTTTGCTTT TCTGGGCTCC TGTAATAATCC ACATCAGAAC CAGTTCCTG CCACCTTACG
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....
	185 195 205 215
146pECO	GCGTGGCCAG CCATCAAAT TCCTTAAACG ATCAA
146pKPN	GCGTGGCCAG CCACAAAAT TCCTTAATAG ATCAA
146pECL	GCGTGGCCAG CCAACAAAAT TCCTTAAACG ATCAA

Fuente: Extraído de Geneious Basic 5.5.7. 2012. Biomatters Ltd.

**Figura 12.** Alineamiento de secuencias del grupo de incompatibilidad IncFrep, (215 pb)

Gris: mutaciones

**Tabla 9.** Porcentaje de identidad entre las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de PCR del grupo de incompatibilidad Frep de los plásmidos portadores del gen *bla<sub>KPC-2</sub>* de las cepas *E. coli* UC327, *K. pneumoniae* UC338 y *E. cloacae* UC347.

<b>Amplicon Frep</b>	<b>146pECO</b>	<b>146pKPN</b>	<b>146pECL</b>
<b>146pECO</b>		82,9%	87%
<b>146pKPN</b>	82,9%		92,1%
<b>146pECL</b>	87%	92,1%	

Fuente: Extraído de Geneious Basic 5.5.7. 2012. Biomatters Ltd.





#### 4. DISCUSIÓN

Los miembros de la familia Enterobacteriaceae resistentes a carbapenémicos, especialmente *K. pneumoniae* XDR (extensivamente resistente) han causado los mayores problemas de terapia a nivel mundial, al estar asociados con un incremento de la morbilidad y mortalidad. Estas bacterias son un riesgo, tanto para la comunidad como para los pacientes hospitalizados, constituyendo un importante problema de salud pública. El principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos es la producción de carbapenemasas, entre las cuales las enzimas KPC han sido asociadas a una variedad de especies de la familia Enterobacteriaceae en muchos países. El éxito de la amplia diseminación de *bla*<sub>KPC</sub> se ha debido a su localización en plásmidos (Wang *et al.*, 2014). Bacterias productoras de KPC son consideradas endémicas en países sudamericanos como Colombia, Puerto Rico, Cuba, México, Brasil y Uruguay (Ocampo *et al.*, 2015; Pitout *et al.*, 2015; Campos *et al.*, 2016; Lee C *et al.*, 2016; Kazmierczak *et al.*, 2016). En marzo de 2012, fue aislada en Chile la primera cepa de *K. pneumoniae* portadora de *bla*<sub>KPC</sub> desde una muestra de orina obtenida de un paciente proveniente de Italia, y hasta el momento esta especie bacteriana es la más importante productora de KPC en Chile y KPC es la carbapenemasa con mayor frecuencia de aislamiento (Cifuentes *et al.*, 2012). Debido a que el gen *bla*<sub>KPC</sub> está inserto en un elemento móvil, un transposón de 10 Kb (Chmelnitsky *et al.*, 2014), se debería esperar que el plásmido contenedor tuviera un tamaño >10 Kb ya que *bla*<sub>KPC</sub> se encuentra en el mencionado ambiente genético en las cepas chilenas (Barría-Loaiza C *et al.*, 2016).

En este estudio se pudo confirmar, mediante tipificación de replicón, que las 8 cepas portadoras del gen de resistencia a carbapenémicos *bla*<sub>KPC-2</sub>, poseían más de un plásmido, de tamaños entre ca. 1,6 Kb a 169 Kb con diferentes replicones. El menor número de plásmidos encontrados fue en las cepas *K. pneumoniae* UC318, *K. pneumoniae* UC329 y *K. oxytoca* UC344.

En la cepa *S. marsces* UC346, el plásmido donde se localiza *bla*<sub>KPC-2</sub> no fue tipificable por el método empleado lo que concuerda con lo informado por Anchordoqui *et al.* (2015), quienes detectaron múltiples plásmidos, de tamaño entre 45 y 300 Kb, en seis cepas clínicas productoras de KPC-2, y los plásmidos que portaban *bla*<sub>KPC-2</sub> en *E. coli* y *K. pneumoniae*, de aproximadamente 70 Kb, no fueron tipificable por PBRT. Este método puede fallar en detectar replicones debido a mutaciones que pueden ocurrir en la secuencia de alineamiento de los partidores (Carattoli *et al.* 2014).

El mayor número de plásmidos diferentes se pudieron determinar en *E. coli* UC327 (IncFIB, IncA/C, IncN e IncY), presentando cuatro grupos de incompatibilidad diferentes. Una vez identificados los plásmidos en donde se localizaba el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> en las cepas en estudio, en el caso de *E. coli* UC327 y *E. cloacae* UC347 la sonda *bla*<sub>KPC</sub> hibridó con dos bandas de ADN plasmidial. Esto se puede explicar debido a que las formas más condensadas y superenrolladas migran más rápido, presentándose como plásmidos de volumen menor (ca. 92 Kb), las formas relajadas y lineales migran más lento (ca. 146 Kb) por lo que se pudo observar dos conformaciones de un mismo plásmido en cada cepa, ya que el patrón de identificación de replicón fue idéntico. Al aislar y purificar las bandas que formaron híbridos con la sonda del gen de carbapenemasa, se identificó que los plásmidos pertenecían al grupo de incompatibilidad IncF en las cepas *E. coli* UC 327, *K. pneumoniae* UC338 y *E. cloacae* UC347. En la cepa *K. oxytoca* UC 344 no se pudo tipificar por el método de Carattoli *et al.* (2005) el grupo de incompatibilidad del plásmido portador del gen *bla*<sub>KPC</sub>. El grupo de incompatibilidad IncF presenta 26 variantes en la familia Enterobacteriaceae, estos plásmidos contribuyen a la capacidad de la bacteria de sobrevivir o replicarse (*fitness* bacteriano) al proveer determinantes de virulencia y resistencia a antimicrobianos, estos han sido asociados con la abrupta aparición mundial de las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) relevantes a nivel clínico (Villa *et al.*, 2010). Estas cuatro cepas, en las que tres eran portadores de un plásmido común, fueron aisladas de diferentes centros de salud de la Región Metropolitana, en los años 2012, 2013 y 2014. *E. coli* UC327 y *E. cloacae* UC347 son aislados autóctonos que presentan

una alta similitud entre los replicones de sus respectivos plásmidos 146pECO y 146pECL permite deducir el origen común del plásmido en estas dos bacterias aisladas con dos años de diferencia, por lo cual no deja de sorprender la diseminación de este elemento genético móvil entre cepas de diferentes recintos de salud chilenos.

El plásmido en donde se encontró *bla*<sub>KPC-2</sub> en las cepas de *E. coli* (146pECO) y *E. cloacae* (146pECL) incluidas en este estudio pertenecen a la variante IncFIB, y el tamaño es de ca. 146 Kb, esto no concuerda con lo encontrado por Tavares *et al.* (2015), que informan que los plásmidos frecuentemente detectados que portaban el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> variaban sobre los 14 Kb y sobre 42 Kb. Gómez *et al.* (2011) describieron en Argentina, dos aislados productores de carbapenemasas KPC-2 que pudieron tipificar como pertenecientes a tres grupos Inc: *E. coli*, IncFIA-IncFIB-IncFrepB y *K. pneumoniae* que portaba plásmidos de tipo IncL/M-IncA/C-IncFIIIs. Por otra parte, Chen *et al.* (2013) reportaron en Nueva York plásmidos que portan *bla*<sub>KPC</sub> de diferentes grupos de incompatibilidad, incluyendo los grupos IncFII, IncL/M, IncN, IncR, IncX, y ColE1 en *K. pneumoniae*. Entre estos, destacaban los plásmidos IncFII como el principal vehículo para la diseminación de KPC en *K. pneumoniae*. El tipo de replicón tipificado en los plásmidos de las ocho cepas estudiadas en el presente trabajo, corresponde a la familia de plásmidos IncF (IncFIIA, IncFIB e IncFrep).

Diversos autores informan y destacan la plasticidad y habilidad de los plásmidos para alterar su estructura por adición o deleción de genes, por transferencia horizontal y/o rearrreglos, destacándose la familia de plásmidos IncF. Estos plásmidos están distribuidos en cepas clínicamente relevantes de la familia Enterobacteriaceae, representando uno de los plásmidos encontrados con mayor frecuencia, lo que indica claramente que están jugando un papel importante en la diseminación de la resistencia a antimicrobianos. Poseen una gran versatilidad de adaptación intracelular, por la rápida evolución de las secuencias regulatorias de los replicones, características que han sido un factor importante en el gran éxito de

este tipo de plásmidos en su diseminación (Villa *et al.*, 2010; Garcillán *et al.*, 2011; Chmelnitsky *et al.*, 2014). Los plásmidos IncF usualmente son plásmidos de bajo número de copia, de tamaño >100 Kb y se han descrito dentro del grupo de plásmidos epidémicos de resistencia que han sido detectados globalmente en Enterobacteriaceae de diferentes orígenes y fuentes (Villa *et al.*, 2010). Varios plásmidos IncFII que codifican KPC han sido completamente secuenciados y caracterizados. El primer plásmido asociado *K. pneumoniae* ST 258, pKpQIL, es un plásmido de 113 Kb perteneciente al grupo IncFII<sub>K2</sub> por PBRT, portador del gen *bla*<sub>KPC3</sub> que se ha diseminado en Estados Unidos, Israel, Polonia, e Italia. Este plásmido también ha sido descrito, posteriormente, en cepas de China, pero el gen *bla*<sub>KPC</sub> en este país se encontraba asociado a cepas de *K. pneumoniae* ST11, indicando la amplia diseminación de este plásmido (Villa *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2014; Lee C *et al.*, 2016). Los análisis de las secuencias de los replicones del grupo IncFrep de los plásmidos portadores de *bla*<sub>KPC</sub> de las tres cepas tipificadas como del grupo de incompatibilidad F, con los portadores de IncFrep de este estudio no permitieron distinguir diferencia alguna entre los plásmidos, ya que las secuencias presentaron sobre 82% de identidad entre ellas (Tabla 9, Figura 12), lo que no permitió identificar alguna variación o divergencia entre plásmidos de las diferentes especies. Con estos resultados sólo se podría concluir que los plásmidos pertenecen a un precursor común del grupo IncFrep.

El plásmido 146pECO de la cepa *E. coli* UC327 portador de *bla*<sub>KPC-2</sub> fue tipificado como plásmido del grupo IncFIB e IncN, esto nos indicó que este plásmido posee dos sistemas de replicación. En la familia de replicones tipo IncF se ha descrito plásmidos de categoría multireplicón en bacterias de la familia Enterobacteriaceae, como *K. pneumoniae* en Paris, o *E. cloacae* en un plásmido multireplicón de tipo IncFIB-IncFIIY portador de la enzima NDM-1, así como también en cepas de *E. coli* y *E. cloacae* de Estados Unidos que portaban plásmidos identificados como IncFIA-IncFII-IncFIB y IncFIA-IncX<sub>3</sub>, respectivamente (Osborn *et al.*, 2000; Compain *et al.*, 2014; Hargreaves *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015).

Plásmidos pertenecientes al grupo de incompatibilidad N (IncN) representan uno de los plásmidos conjugativos de amplio espectro de hospedador, frecuentemente encontrados en Enterobacteriaceae de origen animal y humano. Han sido asociados con genes que confieren resistencia a diversas clases de antimicrobianos, incluyendo genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (García-Fernández *et al.*, 2011; Ahn *et al.*, 2014). Estudios realizados en Estados Unidos han demostrado que plásmidos IncN que portan *bla*<sub>KPC</sub> son comunes en *K. pneumoniae* y *E. coli*, con tamaños que oscilan entre 30 Kb y 190 Kb, son compartidos entre las dos especies (Ahn *et al.*, 2014). Andrade *et al.* (2011), encontraron plásmidos IncN (40 Kb), IncL/M (50-60Kb) e IncFII (130 Kb) asociados a *bla*<sub>KPC-2</sub> en Brasil. Por otra parte, en un estudio global que incluyó seis países, el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> también se encontró asociado a plásmidos de diversos tamaños pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncN (35, 70, 75 y 80 Kb), IncL/M (12, 35 y 75 Kb) e IncFII (80 Kb) (Pereira *et al.*, 2013).

Según lo sugerido por Chmelnitsky *et al.* (2014), los plásmidos de replicones mosaicos pueden ofrecer una ventaja evolutiva, debido a que los plásmidos IncF son plásmidos de un rango de hospedador reducido, al tener un replicón adicional ambos expanden su rango de hospedador y efectos de incompatibilidad. Sin embargo, los replicones en mosaico producen complicaciones adicionales para la clasificación de los plásmidos bacterianos y para evaluación de las relaciones evolutivas entre los plásmidos y sus replicones (Osborn *et al.*, 2000). Pequeños cambios en los determinantes de incompatibilidad de los plásmidos IncF llevan a la compatibilidad, permitiendo la coexistencia de varios plásmidos del grupo de incompatibilidad F. Por ejemplo, esto se ha descrito en estudios de plásmidos derivados de *Yersenia* spp., en donde se detectó, en una cepa de *E. coli*, que dos plásmidos IncFIIY podían coexistir (Wu *et al.*, 2015). La coexistencia dentro del mismo hospedador puede facilitar el intercambio de resistencia a antibióticos por recombinación homóloga, así como la formación de cointegrados (Garcillán *et al.*, 2011). Por lo tanto, el estatus de multireplicón puede permitir la adquisición de plásmidos que portan replicones incompatibles cuando la replicación es dirigida

por un plásmido compatible (Villa *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2015). Tal hipótesis está en concordancia con el modelo de Sykora (1992) de divergencia no selectiva del replicón de un plásmido, en un plásmido co-integrado o multireplicón, donde un replicón es fuertemente conservado debido a la presión selectiva (replicón beta), mientras que el segundo replicón (replicón alfa), que no es responsable del control de la replicación, puede experimentar una sucesión de alteraciones genéticas y es libre de divergir (Osborn *et al.*, 2000; Villa *et al.*, 2010).

En el presente estudio las secuencias de los amplicones correspondientes a los grupos IncFIB en 146pECO y 146pECL de las cepas de *E. coli* y *E. cloacae* respectivamente presentaban un alto porcentaje de identidad, ya que la secuencia del plásmido 146pECL de la cepa *E. cloacae* UC347 sólo presenta dos cambios (Figura 11) en comparación al plásmido 146pECO de la cepa *E. coli* UC327, evidenciando la misma identidad de plásmidos entre cepas de diferentes especies (99,7 % de identidad, Tabla 8). Esto concuerda con lo descrito por Pereira *et al.* (2013) en Brasil, donde el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> fue encontrado asociado a plásmidos compartidos en diferentes especies. Las sustituciones en la secuencia del segundo plásmido (92pECL) de la cepa de *E. cloacae*, que, según lo descrito por Carattoli *et al.* (2005), podría significar la divergencia de un mismo plásmido lo que le permitiría el cohabitar en la misma célula con plásmidos del mismo grupo de incompatibilidad.

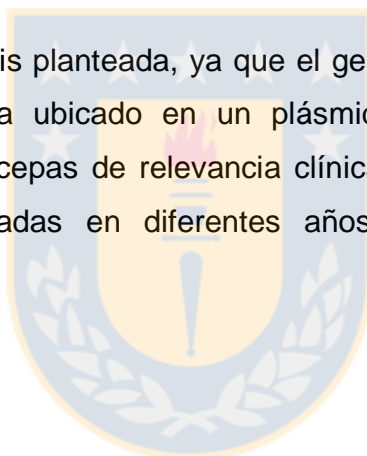
En Chile se repite lo ya informado en países como Estados Unidos e Israel y Argentina, donde el gen que codifica para la carbapenemasa KPC-2 está asociado a un plásmido de diseminación mundial o epidémico de la familia IncF, aunque en la actualidad se ha descrito en Argentina que el grupo de incompatibilidad predominante de plásmidos portadores del gen *bla*<sub>KPC</sub> corresponde a los del grupo IncL/M (Lee *et al.*, 2016), divergiendo por lo descrito por Gómez *et al.* en 2011. Por otra parte, concuerda con lo que se reporta en Brasil, donde este gen se encuentra asociado a plásmidos del grupo IncN (Andrade *et al.*, 2011).

Los resultados de este trabajo son los primeros en lo se refiere a la caracterización de plásmidos portadores de genes *bla*<sub>KPC-2</sub> en Chile. Los resultados obtenidos en este trabajo constituyen la primera descripción de identificación de grupos de incompatibilidad de plásmidos en los que se localiza el gen *bla*<sub>KPC</sub>, que codifica la primera y más frecuente carbapenemasa detectada en enterobacterias en el país. Además, contribuye como un punto de referencia en estudios comparativos con países vecinos, ya que en Latinoamérica los estudios de caracterización de estos elementos genéticos móviles asociados al gen codificante de la carbapenemasa KPC-2 está limitado a un reducido número de países.



## 5. CONCLUSIONES

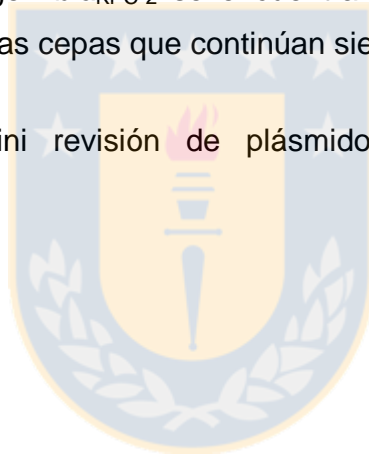
- En cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos aisladas en Chile, productoras de la carbapenemasa KPC-2, el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>, se localiza principalmente en variantes de plásmidos del grupo de incompatibilidad F de un tamaño de ca. 146 Kb.
- La primera cepa de *E. coli* y de *E. cloacae* productora de KPC-2 aislada en Chile presenta la variante IncFIB en los plásmidos 146pECO y 146pECL, y, además, 146pECO de *E. coli* corresponde a un plásmido multireplicón (IncFIB e IncN).
- Se acepta la hipótesis planteada, ya que el gen codificante para la enzima KPC-2 se encuentra ubicado en un plásmido común de ca. 146 Kb, diseminado en tres cepas de relevancia clínica de diferentes especies de enterobacterias aisladas en diferentes años (2012-2014) y diferentes centros de salud.





## 6. PROYECCIONES

- Secuenciar los cuatro plásmidos portadores de *bla*<sub>KPC-2</sub> aislados y caracterizados en el estudio.
- Aislar y secuenciar los plásmidos que albergaban el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> que no se pudieron tipificar por el método de Carattoli y col. (2005).
- Investigar si el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>, detectado en plásmidos, se encuentra también en el ADN cromosomal en las cepas estudio.
- Establecer si el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> se encuentra albergado en plásmidos de origen común en las cepas que continúan siendo aisladas en Chile.
- Elaborar una mini revisión de plásmidos asociados a *bla*<sub>KPC</sub> en Sudamérica.



## 7. REFERENCIAS

Almeida A.C.S., Cavalcanti F.L.S., Martins W.M.B., Vilela M.A., Gales A.C., Morais Junior M.A., Morais M.M.C. 2013. First description of KPC-2 producing *Klebsiella oxytoca* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, **57**(8): 4077-4078.

Anchordoqui M.S., De Belder D., Lucero C., Rapoport M., Faccone D., Rodriguez A., Di Martino A., Martino F., Herrero I., Pasteran F., Corso A., Gómez S.A. 2015. In vivo horizontal dissemination of the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene carried on diverse genetic platforms among clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *J Glob Antimicrob Resist*, **3**(3): 210-213.

Andrade L.N., Curiao T., Ferreira J.C., Longo J.M., Clímaco E.C., Martinez R., Bellissimo-Rodrigues F., Basile-Filho A., Evaristo M.A., Del Peloso P.F., Ribeiro V.B., Barth A.L., Paula M.C., Baquero F., Cantón R., Darini A.L., Coque T.M. 2011. Dissemination of *bla*<sub>KPC-2</sub> by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* Species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, **55**(7): 3579–3583.

Ahn C., Syed A., Hu F., O'Hara J.A., Rivera J.I., Doi Y. 2014. Microbiological features of KPC-producing *Enterobacter* isolates identified in a U.S. hospital system. *Diagn microbiol Infect Dis*, **80**(2): 154-158.

Arend L.N., Toledo P., Pilonetto M., Tuon F.F. 2015. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in different facilities in Southern Brazil. *Am J Infect Control*, **43**(2): 137-140.

Aubron C., Poirel L., Ash R.J., Nordmann P. 2005. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis*, **11**(2): 260-264.

Bakour S., Sahli F., Touati A., Rolain J-M. 2015. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 isolated from cerebrospinal fluid of a child in Algeria. *New Microbe New Infect*, **3**: 34-36.

Barría-Loaiza C., Pincheira A., Quezada M., Vera A., Valenzuela P., Domínguez M., Lima C. A., Araya I., Araya P., Prat S., Aguayo C., Fernández J., Hormazábal J. C., Bello-Toledo H., González-Rocha G. 2016. Molecular typing and genetic environment of the *bla*<sub>KPC</sub> gene in Chilean isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist*, **4**: 28-34.

Barton B.M., Harding G.P., Zucarelli A.J. 1995. A General Method for Detecting and Sizing Large Plasmids. *Anal Biochem*, **226**(2): 235-240.

Brink A.J., Coetzee J., Clay C.G., Sithole S., Richards G.A., Poirel L., Nordmann P. 2012. Emergence of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *J Clin Microbiol*, **50**(2): 525-527.

Bush K. 2013. Carbapenemases: Partners in crime. *J Glob Antimicrob Resist*, **1**(1): 7–16.

Cantón R., Akóva M., Carmeli Y., Giske C.G., Glupczynski Y., Gniadkowski M., Livermore D.M., Miriagou V., Naas T., Rossolini G.M., Samuelsen Ø., Seifert H., Woodford N., Nordmann P., European Network on Carbapenemases. 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect*, **18**(5): 413–431.

Cao X., Xu X., Zhang Z., Shen H., Chen J., Zhang K. 2014. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, **13**:16.

Carattoli A., Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins K.L., Threlfall E.J. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*, **63**(3): 219–228.

Carattoli A., Miriagou V., Bertini A., Loli A., Colinon C., Villa L., Whichard J.M., Rossolini G.M. 2006. Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerg Infect Dis*, **12**(7):1145-1148.

Carattoli A. 2013. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*, **303**(6-7): 298–304.

Carattoli A., Zankari E., García-Fernández A., Voldby-Larsen M., Lund O., Villa L., Møller-Aarestrup F., Hasman H. 2014. In Silico detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob Agents Chemother*, **58**(7): 3895-3903.

Castanheira M., Costello A.J., Deshpande L.M., Jones R.N. 2012. Expansion of Clonal Complex 258 KPC-2 Producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American Hospitals: Report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*, **56** (3): 1668 -1669.

Chagas T.P., Seki L.M., da Silva D.M., Asensi M.D. 2011. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. *J Hosp Infect*, **77**(3): 274–283.

Chattoraj D.K. 2000. Control of Plasmid DNA replication by iterons: no longer paradoxical. *Mol Microbiol*, **37**(3): 467-476.

Chen L., Chavda K.D., Melano R.G., Jacobs M.R., Levi M.H., Bonomo R.A., Kreiswirth B.N. 2013. Complete sequence of a *bla*<sub>KPC-2</sub>-harboring IncFII<sub>K1</sub> plasmid

from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 strain. Antimicrob Agents Chemother, **57**(3): 1542-1545.

Chen L., Mathema B., Chavda K.D., DeLeo F.R., Bonomo R.A., Kreiswirth B.N. 2014. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. Trends Microbiol, **22**(12): 686-696.

Chmelnitsky I., Shklyar M., Leavitt A., Sadovsky E., Navon-Venezia S., Ben Dalak M., Edgar R., Carmeli Y. 2014. Mix and match of KPC-2 encoding plasmids in Enterobacteriaceae-comparative genomics. Diagn Microbiol Infect Dis, **79**(2): 255–260.

Cifuentes M., García P., San Martín P., Silva F., Zúñiga J., Reyes S., Rojas R., Ponce R., Quintanilla R., Delpiano L., Wolff M. 2012. Primer caso de detección de *bla<sub>KPC</sub>* en Chile: desde Italia a un hospital público de Santiago. Rev Chil Infect, **29**(2): 224-228.

Compain F., Frangeul L., Drieux L., Verdet C., Brisse S., Arlet G., Decré D. 2014. Complete nucleotide sequence of two multidrug-resistant IncR plasmids from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, **58**(7): 4207-4210.

Córdoba E., Lespada M.I., Gómez N., Pasterán F., Oviedo V., Rodríguez-Ismael C. 2012. Descripción clínica y epidemiológica de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en Buenos Aires, Argentina. Enferm Infecc Microbiol Clin, **30**(7): 376-379.

Cuzon G., Naas T., Nordmann P. 2011. Functional characterization of *Tn4401*, a Tn3-based transposon involved in *bla<sub>KPC</sub>* gene mobilization. Antimicrob Agents Chemother, **55**(11): 5370–5373.

DeLeo F.R., Chen L., Porcella S.F., Martens C.A., Kobayashi S.D., Porter A.R., Chavda K.D., Jacobs M.R., Mathema B., Olsen R.J., Bonomo R.A., Musser J.M., Kreiswirth B.N. 2014. Molecular dissection of the evolution of carbapenem resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci U S A., **111**(13):4988–4993.

Del Franco M., Paone L., Novati R., Giacomazzi C.G., Bagattini M., Galotto C., Montanera P.G., Triasi M., Zarrilli R. 2015. Molecular epidemiology of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in Valle d'Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 101 (ST101 and ST789). BMC Microbiol, **15**(1): 260.

Djahmi N., Dunyach-Remy C., Pantel A., Dekhil M., Sotto A, Lavigne J.P. 2014. Epidemiology of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries. BioMed Res Int, doi: 10.1155/2014/305784.

Dortet L., Cuzon G., Nordmann P. 2013. Dissemination of carbapenemase producing Enterobacteriaceae in France, 2012. J Antimicrob Chemother, **69**(3): 623-627.

Dotson G.A., NISC, Dekker J.P., Palmore T.N., Segre J.A., Conlan S. 2016. Draft genome sequence of a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-positive sequence type 111 *Pseudomonas aeruginosa* strain. Antimicrob Agents Chemother, **4**(1): e01663-15

Evans B.A., Amyes S.G.B. 2014. OXA  $\beta$ -Lactamases. Clin Microbiol Rev, **27**(2): 241-263.

García-Fernández A., Villa L., Moddley A., Hasman H., Miriagou V., Guardabassi L., Carattoli A. 2011. Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *J Antimicrob Chemother*, **66**(9):1987-1991.

Garcillán-Barcia M.P., Alvarado A., de la Cruz F. 2011. Identification of bacterial plasmid based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol Rev*, **35**(5): 936 – 956.

Geffen Y., Adler A., Paikin S., Khabra E., Gorenstein S., Aronov R., Carmeli Y. 2012. Detection of the plasmid-mediated KPC-2 carbapenem-hydrolysing enzyme in three unusual species of the Enterobacteriaceae family in Israel. *J Antimicrob Chemother*, **68**(3): 719–729.

Geneious Basic (2012). **Biomatters. Versión 5.5.7**. Biomatters Limited. Nueva Zelanda.

Giakkoupi P., Papagiannitsis C.C., Miriagou V., Pappa O., Polemis M., Tryfinopoulou K., Tzouvelekis L.S., Vatopoulos A.C. 2011. An update of the evolving epidemic of *bla*<sub>KPC-2</sub>-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009–10). *J Antimicrob Chemother*, **66**(7): 1510–1513.

Gómez S.A., Pasterán F.G., Faccone D., Tijet N., Rapoport M., Lucero C., Lastovetska O., Albornoz E., Galas M., KPC Group, Melano R.G., Corso A., Petroni A. 2011. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect*, **17**(10): 1520 – 1524.

Gutiérrez C., Labarca J., Román J.C., Sanhueza F., Moraga M., Wozniak A., García P. 2013. Vigilancia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en cultivos rectales en un hospital universitario de Santiago, Chile. *Rev Chil Infect*, **30**(1): 103-106.

Hargreaves M.L., Shaw K.M., Dobbins G., Snippes P.M., Harper J.E., Boxrud D., Lynfield R., Aziz M, Price L.B., Silverstein K.A.T., Danzeisen J.L., Youmans B., Case K., Sreevatsan S., Johnson T.J. 2015. Clonal dissemination of *Enterobacter cloacae* harboring *bla*<sub>KPC-3</sub> in the upper Midwestern United States. *Antimicrob Agents Chemother*, **59**(12): 7723- 7734

Ho P.L., Cheung Y.Y., Lo W.U., Li Z., Chow K.H., Lin C.H., Chan J.F.W., Cheng V.C.C. 2013. Molecular Characterization of an Atypical IncX3 Plasmid pKPC-NY79 Carrying *bla*<sub>KPC-2</sub> in a *Klebsiella pneumoniae*. *Curr Microbiol*, **67**(4):493–498.

Jacoby G., Bush K.. KPC-type-β-Lactamases. Disponible en: <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>. Consultado: 20/08/16.

Kassis-Chikhani N., Frangeul L., Drieux L., Sengelin C., Jarlier V., Brisse S., Arlet G., Decré D. 2013. Complete Nucleotide Sequence of the First KPC-2- and SHV-12- Encoding IncX Plasmid, pKpS90, from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **57**(1): 618–620.

Kazmierczak K.M., Biedenbach D.J., Hackel M., Rabine S., Jonge B.L., Bouchillon S.K., Sahm D.F., Bradford P.A. 2016. Global dissemination of *bla*<sub>KPC</sub> into bacterial species beyond *Klebsiella pneumoniae* and In Vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam. *Antimicrob Agents Chemother*, **60**(8): 4490-4500.

Lee C.R., Lee J.H., Park K.S., Kim Y.B., Jeong B.C., Lee S.H. 2016. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol*, **7**(895): 1- 30. doi:10.3389/fmicb.2016.00895

Machado C.F., Marcondes D., Tavares M., Ribeiro S., Fontana-Maurell M., Alvarez P., Dutra M., Zahner V., DÁlincourt A.P. 2016. Detection of carbapenemase genes



in aquatic environments in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, **60**(7): 4380-4383.

Martínez D., Marcano D., Rodolfo H., Salgado N., Cuacal N., Rodriguez L., Caña L., Medina B., Guzmán M., De Donato M. 2015. KPC and VIM producing *Enterobacter cloacae* strain from a hospital in northeastern Venezuela. *Invest Clin*, **56** (2): 182-187.

Mataseje L.F., Boyd D.A., Willey B.M., Prayitno N., Kreiswirth N., Gelosia A., Poutanen S.M., Low D.E., Jenkins S.G., Katz K., Mulvey M.R. 2011. Plasmid comparison and molecular analysis of *Klebsiella pneumoniae* harboring *bla*<sub>KPC</sub> from New York city and Toronto. *J Antimicrob Chemother*, **66**(6): 1273-1277.

Mathers A.J., Peirano G., Pitout J.D. 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistance *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev*, **28** (3): 565-591.

Meletis G., Tzampaz E., Protonotariou E., Sofianou D. 2010. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>KPC</sub> genes. *HIPPOKRATIA*, **14**(2): 139-140.

Metwally L., Gomaa N., Attallah M., Kamel N. 2013. High prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-mediated resistance in *K. pneumoniae* isolates from Egypt. *East mediter Health J*, **19** (11): 947-952.

Nordmann P., Cuzon G., Naas T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, **9**(4): 228–36.

Nordmann P., Poirel L., Toleman M.A., Walsh T.R. 2011. Does broad-spectrum  $\beta$ -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of

infections caused by Gram-negative bacteria? J Antimicrob Chemother, **66**(4): 689-692.

Nordmann P. 2014. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. Méd Mal Infect, **44**(2): 51–56.

Nordmann P., Poirel L. 2014. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae worldwide. Clin Microbiol Infect, **20**(9): 821-830.

Novick R.P. 1987. Plasmid incompatibility. Microbiol Rev, **51**(4): 381-395.

Ocampo A.M., Vargas C.A., Sierra P.M., Cienfuegos A.V., Jiménez J.N. 2015. Caracterización molecular de un brote de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos en un hospital de alto nivel de complejidad de Medellín, Colombia. Biomed, **35**(4): 496-504.

Oliveira S., Moura R.A., Silva K.C., Pavez M., McCulloch J.A., Dropa M., Matte M.H., Mamizuka E.M., Sato M.I., Pestana de Castro A.F., Lincopan N. 2014. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. J Antimicrob Chemother, **69**(3): 849-852.

Opazo A., Domínguez M., Bello H., Amyes S.G.B., González-Rocha G. 2012. OXA-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. J Infect Dev Ctries, **6**(4): 311-316.

Opazo A. 2014. Prevalencia y contribución de secuencias de inserción en la resistencia a carbapenémicos y colistín en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas en hospitales chilenos. Tesis para optar al Grado de Magíster en Ciencias

mención Microbiología. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela de Post-grado.

Osborn A.M., da Silva F.M., Steyn L.M., Pickup R.W., Saunders J. R. 2000. Mosaic plasmids and mosaic replicons: evolutionary lessons from the analysis of genetic diversity in IncFII-related replicons. *Microbiol*, **146**: 2267-2275.

Partridge S.R. 2014. Tn4401 carrying *bla*<sub>KPC</sub> is inserted within another insertion in pKpQIL and related plasmids. *J Clin Microb*, **52**(12): 4448-4449.

Pereira P.S., de Araujo C.F., Seki L.M., Zahner V., Carvalho-Assef A.P., Asensi M.D. 2013. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Agents Chemother*, **68**: 312-316.

Pitout J.D., Nordmann P., Poirel L. 2015. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother*, **59**(10): 5873-5884.

Poirel L., Lienhard R., Potron A., Malinverni R., Siegrist H.H., Nordmann P. 2011. Plasmid-mediated carbapenem hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Switzerland. *J Antimicrob Chemother*, **66**(3): 675- 676.

Poirel L., Potron A., Nordmann P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*, **67**(7): 1597-1606.

Queenan M. A., Bush K. 2007. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clin Microbiol Rev*, **20**(3): 440–458.

Rapp R.P., Urban C. 2012. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases in Enterobacteriaceae: History, evolution, and microbiology concerns. *Pharmacother*, **32**(5):399–407.

Rasheed J.K., Biddle J.W., Anderson K.F., Washer L., Chenoweth C., Perrin J., Newton D.W., Patel J.B. 2008. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. *J Clin Microbiol*, **46**(6): 2066–2069.

Ribeiro V.B., Andrade L.N., Linhares A.R., Barin J., Daniri A.L., Zavascki A.P., Barth A.L. 2013. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in Southern Brazil. *J Med Microbiol*, **62**(Pt 11): 1721-1727.

Robert J., Pantel A., Mérens A., Lavigne J.P., Nicolas-Chanoine M.H., ONERBA's Carbapenem Resistance Study Group. 2014. Incidence rates of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in France: a prospective nationwide study in 2011–12. *J Antimicrob Chemother*, **69**(10): 2706-2712.

Sambrook J., Russell D.W. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Third Edition, Volume 1, 2,3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. United States of America.

Sánchez M., Bello H., Domínguez M., Mella S., Zemelman R., González G. 2006. Transferencia de  $\beta$ - lactamasas de espectro extendido desde cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* a otras especies de enterobacterias. *Rev Méd Chile*, **134**(4): 415-420.

Sheng J.F., Li J.J., Tu S., Sheng Z.K., Bi S., Zhu M.H., Shen X.M., Li L.J. 2012. *bla*<sub>KPC</sub> and *rmfB* on a single plasmid in *Enterobacter amnigenus* and *Klebsiella*

*pneumoniae* isolates from the same patient. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, **31**(7): 1585-1591.

Tavares C.P., Pereira P.S., Marques Ede A., Faria C. Jr, de Souza Mda P., de Almeida R., Alves Cde F., Asensi M.D., Carvalho-Assef A.P. 2015. Molecular epidemiology of KPC-2- producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) from Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis, **82**(4): 326-330.

Velásquez J., Hernández R., Pamo O., Candiotti M., Pinedo Y., Sacsquispe R., Suárez L., Fernández N. 2013. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. Rev Soc Peru Med Interna, **26**(4): 192-196.

Villa L., García-Fernandez A., Fortini D., Carattoli A. 2010. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. J Antimicrob Chemother, **65**(2): 2518–2529.

Villegas M.V., Lolans K., Correa A., Suarez C.J., Lopez J.A., Vallejo M., Quinn J.P., Colombian Nosocomial Resistance Study Group. 2006. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. Antimicrob Agents Chemother, **50**(8): 2880–2882.

Villegas M.V., Lolans K., Correa A., Kattan J.N., Lopez J.A., Quinn J.P, Colombian Nosocomial Resistance Study Group. 2007. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase. Antimicrob Agents Chemother, **51**(4): 1553-1555.

Walsh T.R. 2010. Emerging carbapenemases: a global perspective. Intern J Antimicrob Agents, **36** (suppl 3): S8–S14.

Wang D., Hou W., Chen J., Mou Y., Yang L., Yang L., Sun X., Chen M. 2014. Characterization of the *bla*<sub>KPC-2</sub> and *bla*<sub>KPC-3</sub> genes and the novel *bla*<sub>KPC-15</sub> gene in *Klebsiella pneumoniae*. J Med Microbiol, **63**(Pt 7): 981-987.

Williams L.E., Wireman J., Hilliard V.C., Summers A.O. 2013. Large plasmids of *Escherichia coli* and *Salmonella* encode highly diverse arrays of accessory genes on common replicon families. Plasmid, **69**(1): 36–48.

Wu W., Feng Y., Carattoli A., Zong Z. 2015. Characterization of an *Enterobacter cloacae* strain producing both KPC and NDM carbapenemases by whole-genome sequencing. Antimicrob Agents Chemother, **59**(10): 6625-6628.

Yao Y., Imirzalioglu C., Hain T., Kaase M., Gaterman S., Exner M., Mielke M., Hauri A., Dragneva Y., Bill R., Wendt C., Wirtz A., Domann E., Chakraborty T. 2014. Complete nucleotide sequence of a *Citrobacter freundii* plasmid carrying KPC-2 in a unique genetic environment. Genome Announc, **2**(6): e01157-14.

Yigit H., Queenan A.M., Anderson G.J., Domenech- Sanchez A., Biddle J.W., Steward C.D., Alberti S., Bush K., Tenover F.C. 2001. Novel carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob agents Chemother, **45**(4): 1151-1161.

Zhang X., Lü X., Zong Z. 2012. *Enterobacteriaceae* producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. Diagn Microbiol Infect Dis, **73**(2): 204-206.