



Universidad de Concepción  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología

**MECANISMOS QUE CONTRIBUYEN EN LOS DIFERENTES NIVELES DE  
RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS EN CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae*  
PRODUCTORAS DE KPC-2 AISLADAS EN CHILE**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

ALEJANDRA FRANCY VERA LEIVA  
CONCEPCIÓN- CHILE  
2017

Profesor Tutor: Dr. Gerardo González Rocha  
Departamento de Microbiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## RESUMEN

Durante las últimas décadas, los antibióticos carbapenémicos han sido utilizados para el tratamiento de infecciones producidas por bacilos Gram negativos multiresistentes; sin embargo, el incremento en el uso de estos antibióticos ha conducido al aumento en la resistencia a estos antibióticos limitando aún más las opciones terapéuticas para el tratamiento de este tipo de infecciones. En Chile, en el año 2012, se informó el primer hallazgo de aislados productores de la carbapenemasa KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), y a la fecha se han informado 242 aislados productores de esta enzima

El principal mecanismo responsable de la resistencia a carbapenémicos corresponde a la producción de carbapenemasas, no obstante, también se ha asociado con otros mecanismos adicionales. Las cepas resistentes a carbapenémicos pueden exhibir un amplio rango de mecanismos de resistencia de estos compuestos, debido principalmente al diferente nivel de expresión del gen *bla*<sub>KPC</sub>, producción de β-lactamasas del tipo BLEE y/o AmpC asociado a una menor expresión de porinas. El objetivo de esta Tesis fue determinar los mecanismos que contribuyen a los diferentes niveles de resistencia a carbapenémicos en cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC-2 aisladas en hospitales Chilenos.

A partir de un grupo de 16 cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC-2 aisladas en hospitales chilenos durante los años 2012 y 2013, se determinó el nivel de resistencia a los carbapenémicos. Posteriormente, se realizó la selección de 4 cepas con diferente nivel de resistencia a carbapenémicos, secuencio- tipo y plataforma genética del gen *bla*<sub>KPC-2</sub>. Se analizó la contribución de los siguientes mecanismos de resistencia 1) Bombas de expulsión: Se realizó ensayos de inhibición en presencia y ausencia de los inhibidores PAβN y CCCP y, por qRT-PCR se determinó la expresión de los genes *acrA*

y *ramA*. 2)  $\beta$ -lactamasas: Se realizó la detección fenotípica y molecular de  $\beta$ -lactamasas del tipo serino y metalo. 3) Porinas OmpK35 y OmpK36: Se determinó el perfil de proteínas de membrana externa mediante SDS-PAGE, y además por qRT-PCR se determinó el nivel de expresión de los genes *ompK35* y *ompK36*. Adicionalmente, se realizó la construcción de mutantes de las porinas mediante el método de intercambio alélico y se determinó la CMI de carbapenémicos. 4) Enzima KPC: La contribución de KPC se determinó mediante el ensayo de curación del gen *bla*<sub>KPC</sub>, y además, se realizó la cuantificación del gen *bla*<sub>KPC</sub> y su expresión por qPCR y qRT-PCR, respectivamente.

Las bombas de expulsión inhibidas por los compuestos PA $\beta$ N y CCCP, no contribuyen en la resistencia a carbapenémicos, ya que la CMI no disminuyó en ninguna de las cepas. Por el contrario, se identificó un incremento en la CMI de carbapenémicos en presencia de PA $\beta$ N, lo cual podría deberse a la alteración en la expresión de los genes de porinas. Por otra parte, se identificó la co-producción de KPC con las  $\beta$ -lactamasas SHV-1, SHV-12, TEM-1, OXA-436 y CTX-M 2. En relación a las porinas se determinó la presencia de inserciones y deleciones en la secuencia nucleotídica en ambos genes. Se identificó que en todas las cepas, OmpK35 estaría ausente y además se identificó variantes de la porina OmpK36. Por otra parte, se determinó que la deleción de los genes *ompK35* y *ompK36* en *K. pneumoniae* TS62, no contribuye en la resistencia a carbapenémicos en cepas no productoras de KPC. No se identificó una relación entre el nivel de expresión de los genes *acrA*, *ramA*, *ompK35*, *ompK36* y *bla*<sub>KPC-2</sub> con la CMI de carbapenémicos, y mediante la curación plásmidica del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> se identificó la pérdida de resistencia a carbapenémicos en todas las cepas.

Las cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC-2 aisladas desde hospitales chilenos presentaron niveles de resistencia a carbapenémicos diferentes entre ellas, principalmente debido a las variaciones en el nivel de expresión del gen *bla*<sub>KPC-2</sub> y en las

variantes de porinas. Adicionalmente, las bombas de expulsión no contribuyen en la resistencia a carbapenémicos.

