

Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud
(ANLIS) “Dr. Carlos Malbrán” – Universidad Nacional de
San Martín (UNSAM)

**Epidemiología molecular de aislamientos clínicos
de *Pseudomonas aeruginosa* productores de
 β -lactamasas tipo KPC**

Autor: Bioq. García Ramírez Dolores

Directora: Dra. Arduino Sonia

Codirector: Dr. Yaryura Pablo Marcelo

Tesis presentada para optar por el título de Magister en Microbiología
Molecular

2016

AGRADECIMIENTOS

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste”. Marie Curie.

Como comienzo de esta tesis quisiera agradecer a todas aquellas personas que de una manera u otra han hecho posible la finalización de este proceso de formación.

En primer lugar quisiera agradecer a todo el personal del laboratorio de bacteriología de CEMIC, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo mi proyecto de investigación en su institución y poniendo a mi disposición todos sus recursos. Quiero hacer una mención especial a Cristina, por escuchar mis problemas y acompañarme en mis horarios inoportunos de trabajo. También quiero agradecer a Marcela, a los servicios de Histocompatibilidad y Virología por dejarme usar sus termocicladores y brindarme todo su apoyo en este trabajo.

A mi directora Sonia gracias por tu fe y confianza en mí, además de brindarme tus consejos y orientación en este trabajo, tu capacidad y conocimiento científico.

Quiero agradecer de todo corazón a mi familia: Mi madre y mi hermano Agustín, quienes siempre me han brindado su amor incondicional y han tenido plena fe y confianza en mí. También muchas gracias por haber sacrificado tantas cosas por apoyarme en mi camino.

También agradezco a mis amigas Romina, Eugenia, Tamara y Marcela por acompañarme siempre, a pesar de que algunos de ellas están lejos.

Y principalmente quiero agradecer a mi esposo y codirector Pablo, cuya persistencia, paciencia y motivación han sido fundamentales para llevar a cabo con éxito este proceso. Además de levantarme cuando me caigo y de alegrarme siempre la vida.

Finalmente quisiera dedicar esta tesis al chiquitín que cambio mi vida, para Tomás con todo mi amor.

TRABAJOS PUBLICADOS Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS SURGIDOS DE ESTA TESIS

- **Dolores García Ramírez**, Federico Nicola, Soledad Zarate, Silvia Relloso, Jorgelina Smayevsky and Sonia Arduino. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* with KPC-type carbapenemase in a teaching hospital: an 8-year study. *Journal of Medical Microbiology* (2013), 62, 1565–1570.

- F. Nicola, **D. García Ramírez**, S. Arduino, M. Di Chiara y J. Smayevsky. Actividad *in vitro* comparativa de doripenem y otros carbapenemes frente a *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Argentina de Microbiología* (2010) 42: 193-198.

- 2012, Emergence of KPC-Producing *P. aeruginosa* in an University Hospital from Buenos Aires, Argentina: An analysis of the past 7 years. **García Ramírez D.**, Zarate S., Relloso S., Nicola F., Smayevsky J. y Arduino S. 112th General Meeting of American Society for microbiology (ASM), San Francisco, Estados Unidos.

- 2009, Fenotipos de Resistencia a β -lactámicos en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes internados (presentación oral). **García Ramírez D.**, Nicola F., Arduino S., Relloso S., Smayevsky J. IX Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología (SADI), Mar del Plata, Argentina.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	123
11. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> es un importante patógeno intrahospitalario	13
12. Mecanismos de resistencia a carbapenemes en <i>P. aeruginosa</i>	14
I2.1. Alteración en la proteína de membrana OprD	14
I2.2. Desrepresión de la cefalosporinasa cromosómica AmpC	15
I2.3. Bombas de eflujo	16
I2.4. β -lactamasas de clase A, B, y D	17
I2.4.1. Carbapenemasas de clase D	19
I2.4.2. Carbapenemasas de clase B	20
I2.4.3. Carbapenemasas de clase A	20
I2.4.3.1. β -lactamasas tipo GES (<i>Guiana extended spectrum</i>)	20
I2.4.3.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasa (KPC)	20
13. Entorno genético de bla_{KPC}	21
I3.1. Definición de Transposón	21
I3.2.1. Transposición conservativa	21
I3.2.2. Transposición replicativa	22
I3.3. Clasificación de los transposones	23
I3.3.1. Clase I	23
I3.3.1.1. Secuencias de inserción (IS)	23
I3.3.1.2. Transposones compuestos	23
I3.3.2. Transposones clase II	24
I3.4. Entorno genético de bla_{KPC} : Estructura del transposón Tn4401	24
I3.4.1. IS <i>Kpn6</i>	25
I3.4.2. IS <i>Kpn7</i>	25
I3.4.3. <i>tnpA</i> y <i>tnpR</i>	25
I3.5. Diferentes entorno genético de bla_{KPC}	25
I3.5.1. Variantes del transposón Tn4401	25
I3.5.2. Otras estructuras transportadoras de bla_{KPC} (NTE _{KPC})	25
I3.6. Plásmidos portadores del transposón Tn4401	26
14. Epidemiología de <i>K. pneumoniae</i> productora de KPC en CEMIC	27
15 Epidemiología de <i>P. aeruginosa</i> productora de KPC en nuestra institución	29

HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	32
MATERIALES Y MÉTODOS	34
M1. Medios de cultivo y de conservación	34
M1.1. Caldo Glicerol 20%	34
M1.2. Agar sangre humana al 5% (AS)	34
M1.3. Agar Muller Hilton (AMH)	35
M1.4. Caldo BHI (Infusión cerebro corazón)	35
M1.5. Caldo MH (Muller Hinton)	35
M2. Soluciones y Geles	36
M2.1. Gel de agarosa al 1,2%	36
M2.2. TBE (Tris, Borato, EDTA) x 0,5	36
M3. Análisis de los niveles de resistencia y perfiles fenotípicos más frecuentes de <i>P. aeruginosa</i> en nuestra institución	37
M3.1. Características de las cepas bacterianas utilizadas	37
M3.2. Análisis estadístico	37
M3.3. Consumo anual de imipenem y meropenem	37
M4. Detección de <i>P. aeruginosa</i> productora de KPC	38
M4.1. Amplificación del gen <i>bla_{KPC}</i> por Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)	38
M4.1.1. Características de las cepas bacterianas utilizadas	38
M4.1.2. Extracción en crudo de ADN o <i>Boiling</i>	39
M4.1.3. Mezcla de los componentes (Mix)	39
M4.1.4. <i>Primers</i>	40
M4.1.5. Amplificación de ADN	40
M4.1.6. Electroforesis en gel de agarosa	40
M4.1.7. Control de calidad	41
M4.1.8. Visualización de resultados	41
M4.1.9. Análisis de secuencias	41
M5. Estudio de sensibilidad	41
M5.1. Cepas bacterianas utilizadas	41
M5.2. Método de difusión por discos	42
M5.3. Método de dilución en agar	42

M5.3.1. Preparación de las soluciones <i>stock</i>	42
M5.3.2. Preparación del Inóculo	44
M5.3.3. Control de calidad	44
M5.3.4. Lectura e interpretación de la CIM	44
M6. Evaluación del entorno genético del gen <i>bla</i>_{KPC} por PCR	44
M6.1. Cepas bacterianas utilizadas	45
M6.2. Extracción en crudo de ADN o <i>Boiling</i>	45
M6.3. Mezcla de los componentes (Mix)	45
M6.4. <i>Primers</i>	46
M6.5. Amplificación de ADN	46
M6.6. Electroforesis en gel de agarosa y Visualización de resultados	46
M6.7. Análisis de secuencias	46
M7. Estudio de la relación clonal de <i>P. aeruginosa</i> productora KPC	47
M7.1. Amplificación por PCR de secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (REP-PCR)	48
M7.1.1. Cepas bacterianas estudiadas	48
M7.1.2. Extracción en crudo de ADN o <i>Boiling</i>	48
M7.1.3. Mezcla de los componentes (Mix)	49
M7.1.4. <i>Primers</i>	49
M7.1.5. Amplificación de ADN	50
M7.1.6. Electroforesis en gel de agarosa y Visualización de resultados	50
M7.1.7. Interpretación de resultados	50
M7.2. <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST)	50
M7.2.1. Cepas bacterianas estudiadas	52
M7.2.2. Extracción de ADN por QIAamp DNA Mini Kit	52
M7.2.3. Mezcla de los componentes (Mix)	53
M7.2.4. <i>Primers</i>	54
M7.2.5. Amplificación de ADN	55
M7.2.6. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de resultados	55
M7.2.7. Purificación del ADN desde el gel	55
M7.2.8. Análisis de secuencias	55
M8. Detección de brotes de bacterias productoras de KPC	56
M8.1. Cepas bacterianas estudiadas	56
M8.2. Sumas acumuladas (CUSUM)	56
M8.3. Diferencia en la tasa de producción de KPC	58
M9. <i>Screening</i> fenotípico de KPC en <i>P. aeruginosa</i>	59

M9.1. Cepas bacterianas utilizadas	59
M9.2. Métodos de Sinergia y Discos combinados con cloxacilina/ácido borónico	59
M9.2.1. Inóculo bacteriano	59
M9.2.2. Soluciones <i>stock</i> de las drogas inhibidoras	60
M9.2.3 <i>Test</i> de Sinergia	60
M9.2.4. <i>Test</i> de Discos combinados	61
M9.3. Método de Hodge modificado	61
M10. Detección de las otras carbapenemasas IMP y VIM	62
M10.1. Inhibición con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para VIM e IMP	63
M10.2. Detección de IMP y VIM por PCR	63
M10.2.1. Cepas bacterianas utilizadas	63
M10.2.2. Extracción en crudo de ADN o <i>Boiling</i>	63
M10.2.3. Mezcla de los componentes (Mix)	63
M10.2.4. <i>Primers</i>	64
M10.2.5. Amplificación de ADN	64
M10.2.6. Control de calidad	64
M10.2.7. Electroforesis en gel de agarosa y Visualización de resultados	64
M11. Confirmación de la de resistencia a colistina	64
M11.1 VITEK® 2 Compact	65
M11.2 Microdilución en caldo MH	65
M11.2.1. Preparación de la solución de Colistina	65
M11.2.2. Preparación del Inóculo	65
M11.2.3 Lectura e interpretación de la CIM	65
M11.3 Método de <i>Etest</i>	65
M11.4 Control de calidad	66
RESULTADOS	678
R1. Epidemiología de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de <i>KPC</i> en nuestra institución	68
R2. Análisis de los niveles de resistencia y perfiles fenotípicos más frecuentes de <i>P. aeruginosa</i> en nuestra institución	72
R3. Detección del gen <i>bla</i>_{KPC} mediante PCR	76
R4. Resultados del estudio de sensibilidad	77

R5. Entorno genético del gen <i>bla</i>KPC por PCR	81
R6. Análisis epidemiológico en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84
R6.1. Estudio de la relación clonal de <i>P. aeruginosa</i> productora KPC	84
R6.2. CUSUM en la detección de brotes por <i>P. aeruginosa</i> productora de KPC	85
R6.3. Diferencia en la tasa de producción de KPC	90
R7. <i>Screening</i> fenotípico de KPC en <i>P. aeruginosa</i>	91
R7.1. <i>Test</i> de sinergia	91
R7.2. <i>Test</i> de Discos combinados	93
R7.3. Método de Hodge modificado	96
R7.4. Método Estadístico (Prueba de Friedman)	97
R8. Resistencia a Colistina	98
DISCUSIÓN	100
RESUMEN	107
BIBLIOGRAFÍA	110

ÍNDICE DE FIGURAS

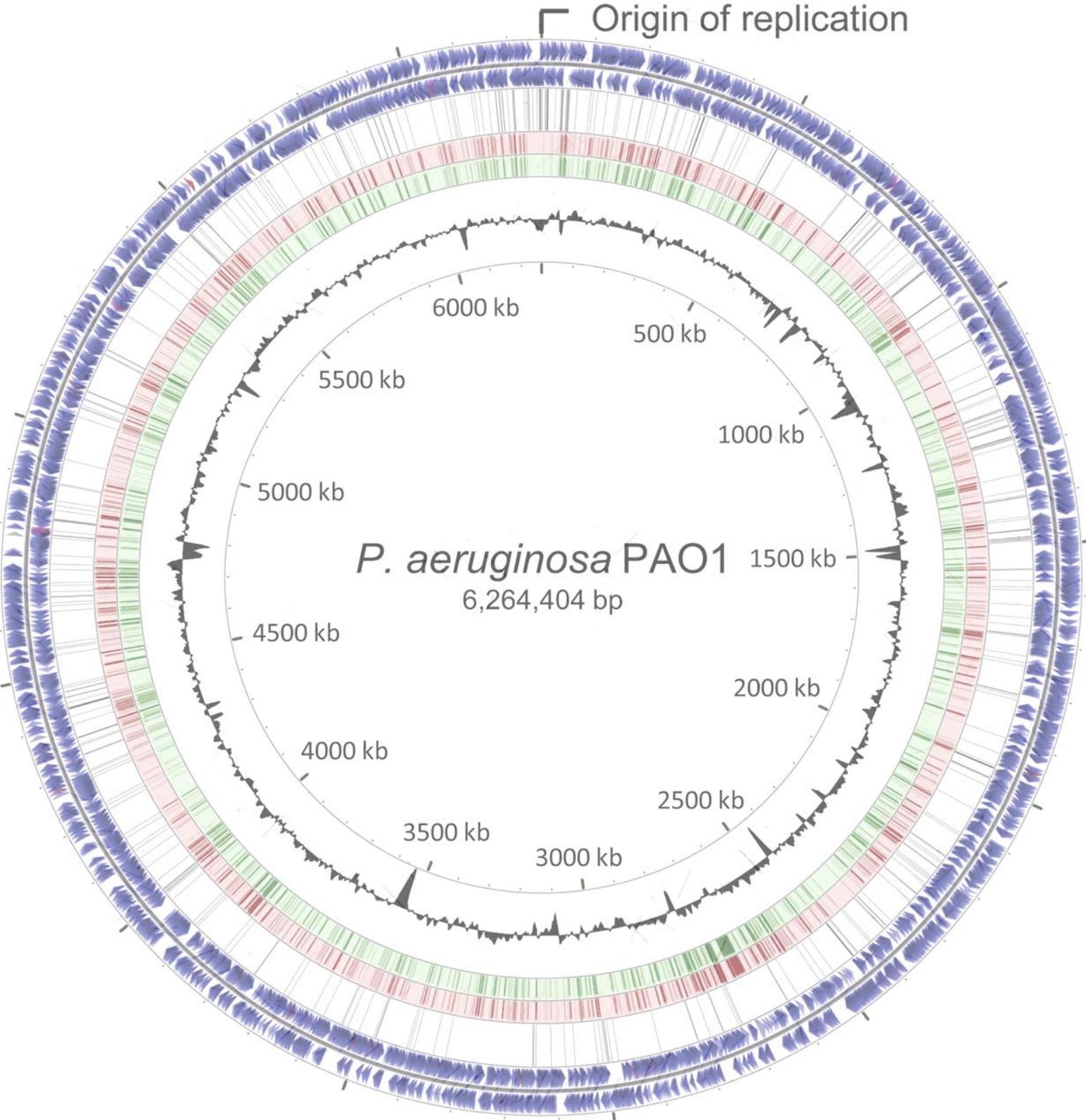
Figura 1: Porcentaje de resistencia a imipenem	14
Figura 2: Desrepresión de la cefalosporinasa cromosómica AmpC	16
Figura 3: Activación de MexT.....	17
Figura 4: Representación esquemática de la transposición conservativa.....	22
Figura 5: Representación esquemática de la transposición replicativa.....	22
Figura 6: Representación esquemática de una IS	23
Figura 7: Representación esquemática de un transposón compuesto	24
Figura 8: Representación esquemática de un transposón clase II.....	24
Figura 9: Representación esquemática del transposón Tn4401.....	24
Figura 10: Diferentes estructuras transportadoras del gen <i>bla</i> _{KPC}	26
Figura 11: Relación clonal de aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> KPC (+).....	28
Figura 12: Esquema del transposón Tn4401	45
Figura 13: Diagrama esquemática de la REP-PCR.	48
Figura 14: Diagrama esquemática de MLST.....	51
Figura 15: Carta esquemática de valores de CUSUM	57
Figura 16: Localización de los discos de antimicrobianos e inhibidores en el <i>test</i> de sinergia	60
Figura 17: Localización de los discos de antimicrobianos e inhibidores en el <i>test</i> de discos combinados.....	61
Figura 18: Representación esquemática del <i>test</i> de Hodge modificado.	62
Figura 19: Distribución del porcentaje de resistencia a carbapenemes en <i>K. pneumoniae</i> (enero del 2009-abril del 2012)	68
Figura 20: Gráfico de CUSUM para <i>K. pneumoniae</i>	71
Figura 21: Distribución de los aislamientos según su material de origen.....	72
Figura 22: Porcentajes de resistencia a antibióticos antipseudomonales	73
Figura 23: Distribución de los perfiles fenotípicos de los antibióticos β -lactámicos (BL).....	74
Figura 24: Resistencia a antibióticos no β -lactámicos (2005-2008), según fenotipos de resistencia. 75	
Figura 25: Curva de consumo de los carbapenemes durante el período 2002–2007.....	76
Figura 26: Distribución de KPC en <i>P. aeruginosa</i>	77
Figura 27: Distribución de los halos de inhibición y valores de CIMs a imipenem.	79
Figura 28: Distribución de los halos de inhibición y valores de CIMs a ceftazidima.....	79
Figura 29: Alineamiento de las Isoformas del Tn4401.....	82
Figura 30: Alineamiento del Tn4401 con estructuras reportadas en diferentes NTE _{KPC}	83
Figura 31: Gel de REP-PCR correspondiente a 12 aislamientos productores de KPC.....	84
Figura 32: Gráfico de CUSUM para <i>P. aeruginosa</i>	89
Figura 33: Diferencia en la tasa (T) de producción de KPC.....	91

Figura 34: <i>Test</i> de Sinergia.....	92
Figura 35: Resultados del <i>test</i> de discos combinados.....	94
Figura 36: <i>Test</i> de Discos combinados.....	95
Figura 37: Método de Hodge modificado.....	96
Figura 38: Método de difusión por discos e <i>Etest</i> para colistina.....	98
Figura 39: Aislamientos de Kpn-KPC provenientes de hemocultivos, 2013.....	103

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Carbapenemasas destacadas en especies del género <i>Pseudomonas</i>	19
Tabla 2: Distribución de los aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> de acuerdo a su origen.....	39
Tabla 3: Descripción de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen <i>bla</i> _{KPC}	40
Tabla 4: Soluciones solvente y diluyente de las drogas estudiadas por el método de dilución en agar	43
Tabla 5: Esquema de diluciones seriadas del método de CIM.....	43
Tabla 6: Descripción de los oligonucleótidos utilizados en el estudio del entorno genético.....	46
Tabla 7: Descripción de los oligonucleótidos utilizados en la REP-PCR.....	49
Tabla 8: Descripción de los oligonucleótidos utilizados en el MLST.....	54
Tabla 9: Descripción de los oligonucleótidos utilizados en la detección de metalo-β-lactamasas.....	64
Tabla 10: Descripción de la sensibilidad a carbapenemes por mes (2009-2012).....	69
Tabla 11: Valores de CUSUM para detectar distintos porcentajes de resistencia.....	70
Tabla 12: DDD por 1.000 pacientes día por año (2002-2007).....	75
Tabla 13: Distribución de los halos de inhibición bacteriana (mm) en el antibiograma por difusión... 78	
Tabla 14: Halos de inhibición (mm) a los distintos antipseudomonales de los aislamientos productores de metalo-β-lactamasas.....	79
Tabla 15: Distribución de los valores de CIM (μg/mL) para imipenem, meropenem, ceftazidima y cefepime.....	80
Tabla 16: Resultados de la PCR para <i>bla</i> _{KPC} en <i>P. aeruginosa</i> , por mes en el período comprendido entre enero del 2009 y abril del 2014.....	86
Tabla 17: Valores de CUSUM para diferentes puntos o porcentajes de resistencia.....	88
Tabla 18: Cálculo de la diferencia en la tasa de producción de KPC con respecto al período anterior para <i>K. pneumoniae</i>	90
Tabla 19: Cálculo de la diferencia en la tasa de producción de KPC con respecto al período anterior para <i>P. aeruginosa</i>	90
Tabla 20: Resultados del <i>test</i> de sinergia con imipenem.....	93
Tabla 21: Resultados del <i>test</i> de sinergia con meropenem.....	93
Tabla 22: Resultados del <i>test</i> de Discos combinados con imipenem.....	95
Tabla 23: Resultados del <i>test</i> de Discos combinados con meropenem.....	96
Tabla 24: Resultados del método de Hodge modificado.....	97
Tabla 25: <i>Test</i> estadístico de Friedman aplicado a los tres métodos evaluados.....	97
Tabla 26: Valores de colistina por los diferentes métodos evaluados.....	98

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

11. *Pseudomonas aeruginosa* es un importante patógeno intrahospitalario

P. aeruginosa (Pae) es un bacilo Gram negativo que entre sus características destacables, posee bajos requerimientos nutricionales y una gran ubicuidad, persistiendo en desinfectantes, jabones, equipos de terapia respiratoria, nebulizadores, soluciones de lentes de contacto, piletas, suelos, etc. Estas particularidades así como su gran variedad de factores de patogenicidad, lo convierten en un importante agente causal de infecciones asociadas al ámbito hospitalario y de la comunidad. Este microorganismo puede causar: infecciones respiratorias en pacientes fibroquísticos, infección urinaria, infección de sitio quirúrgico, bacteriemias, infecciones oculares, otitis y sinusitis. Además, es uno de los principales agentes etiológicos de la neumonía asociada a ventilación mecánica (Gales *et al.* 2012; Sader *et al.* 2014), la cual se caracteriza por una alta morbi-mortalidad con incremento de la estadía y costos hospitalarios (Lister *et al.* 2009; Nicolau & Oliver 2010).

Una de las principales complicaciones en el tratamiento de las infecciones causadas por esta bacteria, es su alta resistencia intrínseca a distintos grupos de antibióticos y su gran capacidad de desarrollar y/o adquirir nuevos mecanismos de resistencia. Esto conlleva a un incremento en la frecuencia de aparición de cepas multirresistentes disminuyendo notablemente las opciones terapéuticas (Morita *et al.* 2014).

Los carbapenemes al igual que los otros antibióticos betalactámicos poseen un anillo lactámico. Aunque a diferencia del resto de los integrantes de este grupo tienen un átomo de carbono en sustitución del grupo sulfona en la posición 4 del motivo tiazolidínico (Kattan *et al.* 2008). Entre los carbapenemes más utilizados destacan imipenem y meropenem, los cuales se caracterizan por ser antimicrobianos de amplio espectro y estables frente a la hidrólisis de la mayoría de las β -lactamasas. Los mismos constituyen una importante opción terapéutica en infecciones graves causadas por bacterias multi-resistentes, como consecuencia de ello en los últimos años se ha observado un incremento en la resistencia a nivel mundial. En América Latina el programa SENTRY reportó, que los porcentajes de resistencia de Pae a imipenem y meropenem se incrementaron de un 23% y 20% en el año 1998 a un 38% y 36% respectivamente en el año 2001 (Andrade *et al.* 2003). En Argentina el porcentaje de resistencia a imipenem para el período 2008-2010 (**Figura 1**), reportado por el programa SENTRY fue del 46% (Gales *et al.* 2012).

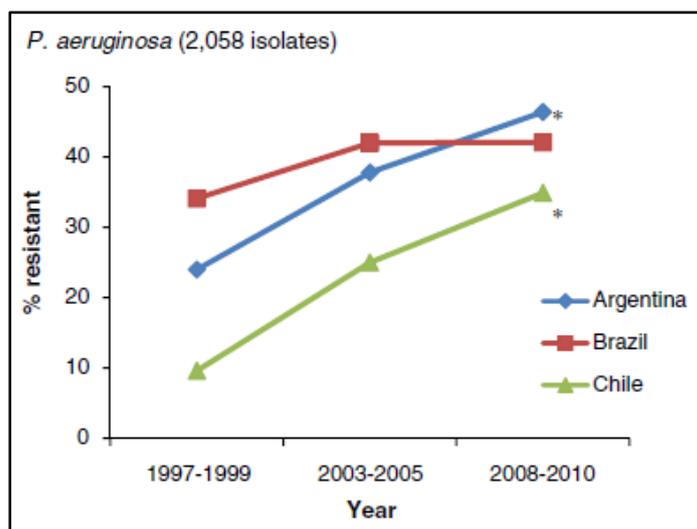


Figura 1: Porcentaje de resistencia a imipenem. Tomado de Gales *et al.* (2012).

* Diferencia estadísticamente significativa.

I2. Mecanismos de resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa*

La resistencia se debe a la presencia de diferentes mecanismos, los cuales pueden encontrarse solos o combinados. A continuación se detallan los mismos.

I2.1. Alteración en la proteína de membrana OprD

Las porinas son proteínas transmembrana que constituyen canales o poros relativamente inespecíficos, los cuales permiten la difusión pasiva de iones y pequeñas moléculas hidrofílicas como azúcares, aminoácidos y antibióticos (Li *et al.* 2012). Dentro de esta familia de proteínas se encuentra la porina **OprD**, a través de este canal ingresa imipenem y en menor grado meropenem (Riera *et al.* 2011).

Las mutaciones en *oprD* pueden generar un codón stop prematuro, una terminación temprana de la traducción, o interferir con la expresión de esta proteína a nivel transcripcional (Castanheira *et al.* 2014). Este gen también puede verse afectado por la inserción de elementos genéticos móviles denominados secuencias de inserción (IS), los cuales provocan una disrupción del mismo (Volter *et al.* 2004; Fowler & Hanson 2014).

Si bien la pérdida de OprD se asocia con resistencia a imipenem e incrementos de los valores de CIM (concentración inhibitoria mínima) a meropenem, existen cepas sensibles a imipenem que presentan mutaciones en *oprD*, lo cual indicaría la existencia de otras vías de entrada (El Amin *et al.* 2005).

12.2. Desrepresión de la cefalosporinasa cromosómica AmpC

Durante el normal crecimiento bacteriano, el componente peptidoglicano de la pared bacteriana es degradado a 1,6- anhidromuropéptidos, mediante la acción de la **PBP4 (penicillin binding protein 4)** y otras enzimas bacterianas. Los 1,6-anhidromuropéptidos generados en el espacio periplasmático son internalizados a través de la permeasa de membrana interna **AmpG**, una vez en el citosol son hidrolizados mediante la acción de **AmpD** (N-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase citosólica) y posteriormente degradados a UDP-MurNac-pentapéptidos (Jacoby 2009; Lister *et al.* 2009).

Los UDP-MurNac-pentapéptidos se unen al represor **AmpR** (regulador transcripcional negativo de *ampC*, perteneciente a la familia LysR), el cual adquiere una conformación que dificulta la unión de la RNA polimerasa al promotor de *ampC*, esto ocasiona la disminución de la expresión de esta enzima, produciendo resistencia a ampicilina y cefalosporinas de 1^o y 2^o generación (Lister *et al.* 2009).

Sin embargo, durante el crecimiento bacteriano en presencia de ciertos antibióticos β -lactámicos como cefoxitina e imipenem, se producen altos niveles de AmpC, se postula que un incremento de los 1-6 anhidromuropéptidos saturaría AmpG y desplazaría los UDP-MurNac-pentapéptidos de su unión al represor AmpR, el cual cambiaría su conformación y permitiría la unión de la RNA polimerasa. Este incremento en la expresión de AmpC se revierte al desaparecer el inductor. Otra posibilidad es la inhibición de la PBP4 por parte de dichos antibióticos β -lactámicos, desencadenando la activación del sistema regulador de dos componentes CreBC que disparan la expresión de AmpC (Moya *et al.* 2009; Fisher & Mobashery 2014).

Las mutaciones en *ampD* y en *ampR*, se asocian con un incremento en la expresión de AmpC (desrepresión) Este hecho origina la resistencia a cefalosporinas de 3^o generación y sensibilidad disminuida o resistencia a cefalosporinas de 4^o generación. Esto último puede deberse a una sumatoria de efectos, desrepresión de AmpC junto con mutaciones en *oprD* (impermeabilidad), desencadenando una acumulación de la cefalosporinasa AmpC en el espacio periplasmático (**Figura 2**). Sin embargo la relación entre desrepresión de AmpC y la susceptibilidad a carbapenemes en *Pae* todavía no ha sido completamente dilucidada (Schmidtke & Hanson 2008).

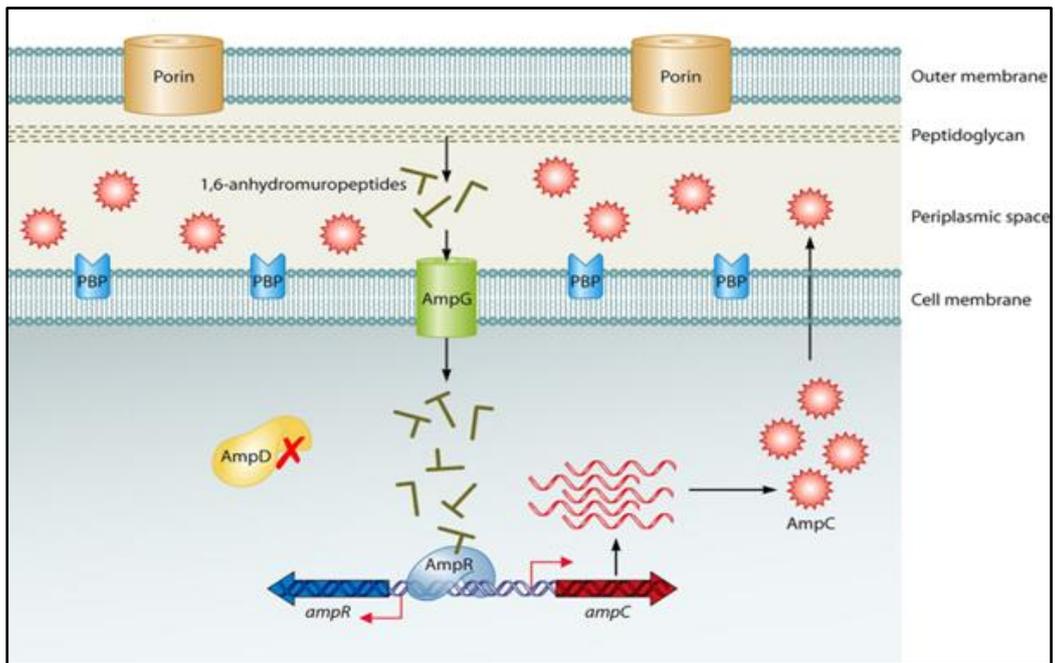


Figura 2: Desrepresión de la cefalosporinasa cromosómica AmpC. Tomado de Lister, et al. (2009).

Dentro de las β -lactamasas tipo AmpC existe un sub grupo de enzimas denominadas cefalosporinasas de espectro extendido (ESACs), las cuales tendrían cierta actividad hidrolítica sobre los carbapenemes. Por lo que su sobreproducción en combinación a la pérdida de OprD y/o bombas de eflujo causarían susceptibilidad disminuida o resistencia a los carbapenemes (Rodríguez-Martínez *et al.* 2009).

12.3. Bombas de eflujo

Otros mecanismos de resistencia a antibióticos que ha adquirido Pae están basados en bombas de expulsión de la droga. Estos sistemas pertenecientes a la familia de transportadores RND (resistance-nodulation-division) están formados por tres componentes: una proteína transportadora ubicada en la membrana interna, una proteína accesoria periplasmática y una proteína de membrana externa o porina. Tienen un amplio rango de sustratos por lo que afectan en mayor o menor grado a diferentes familias de antibióticos. Existen diversos tipos de bombas de eflujo que le confieren a Pae la capacidad de resistir a distintos antibióticos, entre los sistemas de expulsión más importantes podemos mencionar: **MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM** (Fernández & Hancock 2012).

El sistema MexAB-OprM puede expulsar distintas familias de antibióticos incluido meropenem contribuyendo a su resistencia, sin embargo, este sistema es incapaz de

funcionar para imipenem, La sobreexpresión de esta bomba se debe a mutaciones en el gen represor *mexR* o en los reguladores secundarios *nalC* y *nalD* (Poole 2011).

Por otro lado el sistema MexEF-OprN tiene menor capacidad de expulsar carbapenemes, pero su hiperexpresión se relaciona con la pérdida de sensibilidad a estos antibióticos, debido a que la activación de MexT (regulador primario) regula positivamente la transcripción de *mexEF-oprN* y negativamente la de *oprD*. La pérdida de MexS (regulador secundario), una oxidorreductasa deshidrogenasa, podría causar acumulación de metabolitos que alterarían el estado conformacional de MexT (**Figura 3**), con su consecuente activación (Lister *et al.* 2009; Xavier *et al.* 2010).

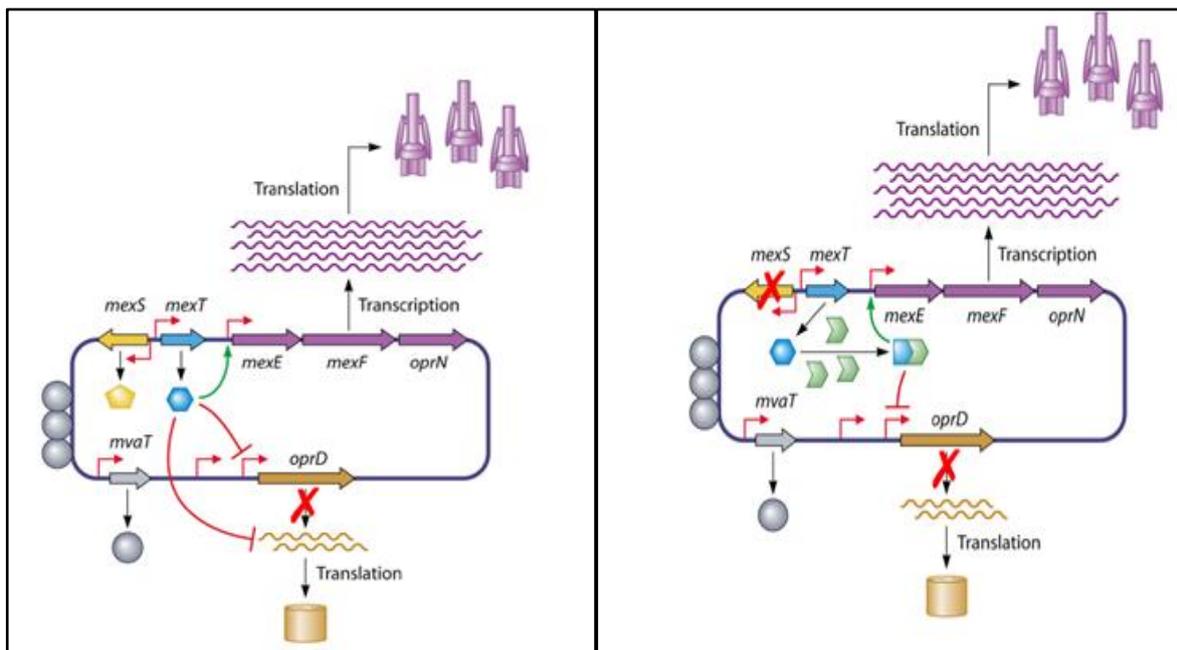


Figura 3: Activación de MexT. Tomado de Lister *et al.* (2009).

12.4. β -lactamasas de clase A, B, y D

Son el principal mecanismo de defensa de las bacterias Gram negativas, ya que tienen la capacidad de hidrolizar el anillo β -lactámico de los antibióticos. Si bien el grado de hidrólisis depende del tipo de enzima presente, la misma puede expresar diferentes fenotipos de resistencia, puede haber un incremento de la dosis génica mediante la presencia de más de una copia del gen y/o plásmido, o un incremento en la actividad del promotor debido a mutaciones o inserción de IS. Además algunos microorganismos como Pae poseen sistemas de eflujo que reducen la concentración intracelular del antibiótico permitiendo que la enzima inactive el mismo aun teniendo capacidad hidrolítica limitada. Un

efecto similar se consigue con la disminución de la expresión de la porina de membrana externa requerida para el ingreso del antimicrobiano (Lister *et al.* 2009; Nicolau & Oliver 2010).

A diferencia de otros mecanismos de resistencia las β -lactamasas pueden estar codificadas cromosómicamente o en elementos transferibles, transposones y/o integrones, los cuales a su vez son transportados por plásmidos, con gran impacto clínico y epidemiológico (Poole 2011). A continuación se define brevemente los elementos transferibles recién mencionados.

Transposón: Es una secuencia de ADN que puede moverse independientemente a diferentes partes del genoma de una célula. Descriptos más ampliamente en el Apartado **I3.1**.

Integrón: Poseen una enzima integrasa, la cual reconoce e incorpora genes en *cassettes* móviles. Además tienen un promotor que permite la correcta expresión de dichos genes. Los integrones no son autotransferibles, sin embargo se encuentran frecuentemente asociados con transposones y plásmidos, lo que permite su movilización (Di Conza & Gutkind 2010).

Plásmidos: Es ADN extra cromosómico, el cual puede ser pueden ser lineal o circular y su tamaño es variable (1- >100 kb). Se movilizan entre diferentes células bacterianas a través de un proceso denominado conjugación. A pesar de que los plásmidos codifican los genes necesarios para la iniciación de su replicación, requieren de ciertos factores codificados por la célula hospedadora para llevar a cabo el proceso completo (Petersen 2011).

A su vez las β -lactamasas se pueden clasificar en dos grandes grupos, serín- β -lactamasas, que poseen un grupo serina en su sitio activo y las metalo- β -lactamasas las cuales requieren de iones zinc como cofactor. Las carbapenemasas son β -lactamasas transferibles con actividad hidrolítica sobre los carbapenemes, pueden pertenecer a las clases A, B o D de la clasificación de Ambler (1980).

Clase ^a	Grupo funcional ^b	Carbapenemasa	Variante	Año de la primera detección	Países en que se ha detectado	Especie	Localización
A	2f	KPC	2	2006	Colombia	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídica (no en integrones)
		GES	5 2	2006 2000	Puerto Rico Sudáfrica	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídica, en integrones de clase 1
B	3	IMP	1, 2, 4, 6 a 16, 18 a 22, 25 y 26	2004	China, Brasil, España	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mendocina</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. fluorescens</i>	Plasmídica, en integrones de clases 1 y 3 (menos frecuentes)
				1991	Mundial, principalmente extremo Oriente-Pacífico		
		VIM	1 a 11, 13 a 18, y 20	1997	Mundial, principalmente Europa	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. pseudoalcaligenes</i>	Plasmídica, en integrones de clase 1 (también cromosómica)
		SPM	1	1997	Brasil, Suiza	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídica (no en integrones)
		GIM	1	2002	Alemania	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídica, en integrón de clase 1
D	2d	AIM	1	2007 ^c	Australia	<i>P. aeruginosa</i>	ND ^d
		DIM	1	2009 ^c	Holanda	<i>P. stutzeri</i>	Integrón de clase 1
		OXA	40	2008 ^c	España	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídica (no en integrones)
			50a a 50d (PoxB ^e)	2004 ^c	Francia ^f	<i>P. aeruginosa</i>	Cromosómica

^aClase según la clasificación de Ambler²².
^bGrupo según la clasificación funcional de Bush et al³⁶.
^cCorresponde al año de publicación, no de detección.
^dND: no hay datos disponibles.
^eEn condiciones normales, PoxB no se expresa de manera significativa.
^fSe cita como país de detección, porque es donde se descubrió, pero PoxB está presente de manera intrínseca en el genoma de *P. aeruginosa*.

Tabla 1: Carbapenemasas destacadas en especies del género *Pseudomonas*. Tomado de Nicolau and Oliver (2010).

12.4.1. Carbapenemasas de clase D

Son β -lactamasas “tipo **OXA**” (oxacilinasas) habitualmente detectadas en *A. baumannii*. Habitualmente se encuentran en integrones situados en plásmidos o transposones y en ciertos casos asociadas a IS. Poseen cuatro motivos bien conservados Ser₇₀-X-X-Lys, Ser₁₁₈-X-Va/Ile, Lys₂₁₆-Thr/Ser-Gly y Trp₂₃₂-X-X-Gly. Usualmente no son inhibidas por ácido clavulánico, tazobactam y subactam (Poirel *et al.* 2010).

Estas enzimas tiene una escasa actividad hidrolítica sobre los carbapenemes (siendo mayor sobre imipenem que sobre meropenem), sin embargo es preocupante el incremento de β -lactamasas clase D con actividad hidrolítica sobre estos antibióticos (June *et al.* 2014).

En Pae se han detectado una carbapenemasa transferible de clase D denominada OXA-40 (Sevillano *et al.* 2009) y oxacilinasas cromosómicas que parecen no expresarse en condiciones normales como OXA-50a a -50d (Nicolau & Oliver 2010).

12.4.2. Carbapenemasas de clase B

Se denominan metalo- β -lactamasas, poseen un motivo de unión al zinc (His-X-His-X-Asp) y son inhibidas por quelantes metálicos como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Nicolau & Oliver 2010).

En Pae han sido descritas distintas variantes de **IMP** (imipenemase) y **VIM** (Veronese Imipenemase) codificadas por integrones, en general las IMP parecen tener menor capacidad hidrolítica que las VIM. A su vez existen pocos reportes de GIM-1 (Castanheira *et al.* 2004; Zhao & Hu 2010) y AIM-1 (Yong *et al.* 2012), a nivel mundial.

12.4.3. Carbapenemasas de clase A

Pertenece al grupo 2f de la clasificación funcional de Bush *et al.* (1995). Todas tienen en su sitio activo tres motivos altamente conservados (Ser₇₀-X-X-Lys, Ser₁₃₀-Asp-Asn y Glu₁₆₆) (Nicolau & Oliver 2010).

12.4.3.1. β -lactamasas tipo GES (*Guiana extended spectrum*)

Han sido definidas como β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), pero las GES-2, -4, -5, -6, -14 y 18 tendrían actividad carbapenemasa debido a la presencia de serina o asparagina en la posición 170. En Pae se han evidenciado las variantes 2, 5 y 18, las cuales son codificadas por integrones transportados por plásmidos (Bebrone *et al.* 2013).

12.4.3.2. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC)

Es una enzima de tipo serino carbapenemasa, inicialmente detectada en una cepa de *K. pneumoniae* de Estados Unidos en 1996 (Yigit *et al.* 2001).

Desde su descubrimiento, la KPC se ha diseminado rápidamente intra e inter especie (Nordmann *et al.* 2009; Muñoz-Price *et al.* 2013). En el año 2007, el CDC reportó que el 8% de todos los aislamientos de *Klebsiella* spp. eran productores de KPC, comparado con menos del 1% en el año 2000 (Echeverri Toro & Cataño Correa 2010). Por otra parte, en Latino América, el programa SENTRY reveló que el 3,3% de los aislamientos de *Enterobacteriaceae* colectados durante el 2010, provenientes de cinco países de América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colombia y México), fueron productores de KPC-2, con un dramático incremento de la resistencia a los carbapenemes (Castanheira *et al.* 2012).

Hasta la fecha se han reportado 21 variantes genéticas de esta β -lactamasa (KPC-2 a KPC-22), en distintos países y especies bacterianas, siendo KPC-2 y KPC-3 las variantes más frecuentemente descritas (Dortet *et al.* 2013; Chen *et al.* 2014b). En Pae solo han sido detectadas dos variantes KPC-2, descrita por primera vez en Colombia (Villegas *et al.* 2007) y KPC-5 reportada únicamente en Puerto Rico (Wolter *et al.* 2009b).

Las carbapenemasas tipo KPC, a diferencia de lo que sucede con otras resistencias las cuales se encuentran en *cassettes* genéticos dentro de integrones, están insertas en otros elementos móviles como son los transposones, los cuales a su vez tienen localización plasmídica. Recientemente ha sido caracterizado el entorno genético del gen *bla*_{KPC}, el transposón Tn4401 y sus variantes (Naas *et al.* 2008; Rice *et al.* 2008; Shen *et al.* 2009; Curiao *et al.* 2010; Cuzon *et al.* 2011; Gomez *et al.* 2011; Pasteran *et al.* 2012).

I3. Entorno genético de *bla*_{KPC}

Antes de introducirnos en esta temática, resulta imprescindible definir algunos mecanismos y estructuras moleculares que serán importantes para una mejor comprensión de este tipo de resistencia.

I3.1. Definición de Transposón

Son elementos genéticos móviles que tienen la capacidad de desplazarse entre diferentes tipos de secuencias de ADN (de un plásmido a otro, de un plásmido a un cromosoma y viceversa). Al movimiento de un transposón se lo denomina transposición, y a la enzima que codifica y promueve dicho proceso, transposasa (Kleckner 1981). La recombinación ocurrida durante la transposición es aleatoria y no específica ya que no requiere de homología entre las secuencias que se recombinan. Este tipo de recombinación puede ser conservativa o replicativa (Reznikoff 2008; Toleman & Walsh 2011).

I3.2.1. Transposición conservativa

Este modelo es conocido como de “corte y pegado”. El transposón es precisamente escindido de su ubicación original en el ADN del donante y luego se inserta en la secuencia diana del ADN receptor (**Figura 4**), sin aumentar el número de copias del transposón.

Todos los pasos de la transposición son catalizados por la transposasa, aunque en la mayoría de los organismos se requiere de proteínas adicionales de la maquinaria celular para poder realizar este proceso (Reznikoff 2008).

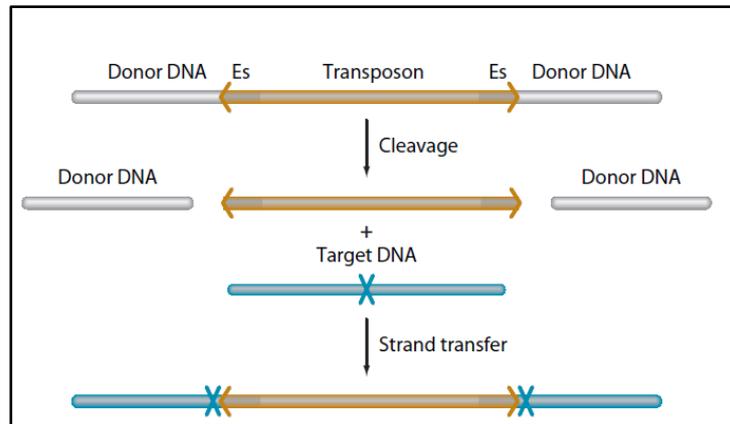


Figura 4: Representación esquemática de la transposición conservativa. Tomado de Reznikoff (2008).

13.2.2. Transposición replicativa

La transposasa reconoce ciertas secuencias localizadas en los extremos del transposón (**secuencias repetidas invertidas**), así como el sitio receptor donde se insertara una nueva copia del transposón, corta en ambos puntos y liga, con la formación de un intermediario denominado cointegrado. La resolvasa (codificada por el gen *tnpR*) reconoce específicamente el sitio de recombinación o *res*, corta, une y resuelve el cointegrado. El sitio *res* está solapado con el promotor del gen de la transposasa, de modo que la resolvasa no sólo resuelve el cointegrado, sino que reprime la expresión de la transposasa (**Figura 5**). Este es un proceso preciso y altamente controlado, por lo que mutaciones en *tnpR* podrían ocasionar un aumento de la tasa de transposición (Toleman & Walsh 2011).

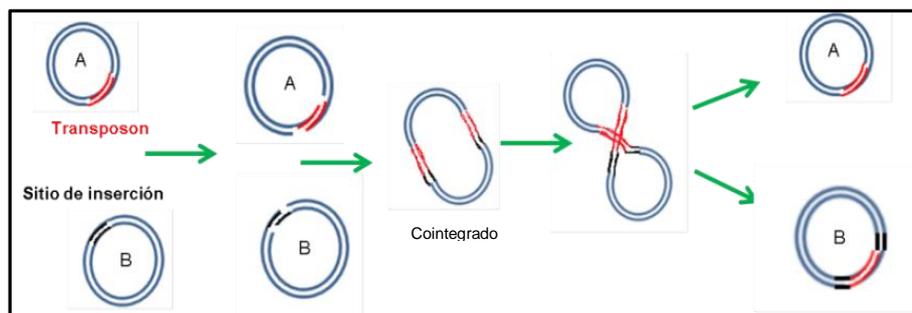


Figura 5: Representación esquemática de la transposición replicativa.

I3.3. Clasificación de los transposones

I3.3.1. Clase I

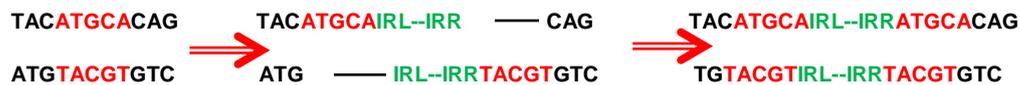
I3.3.1.1. Secuencias de inserción (IS)

Son los transposones más simples, se transponen en forma conservativa y están constituidos por el gen codificante de la transposasa, flanqueado por secuencias repetidas dispuestas en orientación inversa, denominadas **secuencias repetidas invertidas (IR)**, las cuales suelen tener entre 10 y 30 pares de bases (pb), y presentan entre si una alta homología (**Figura 6**).



Figura 6: Representación esquemática de una IS. IRR e IRL (*Inverted Repeat Right/Left*).

Las IR son el sitio de reconocimiento específico de la transposasa, y además son el punto de anclaje de las reacciones de corte y transferencia de cadena que llevan a la transposición del elemento. Tras la inserción ocurre un proceso natural de rellenado de “huecos” que deriva en la formación **secuencias cortas repetidas directas (DR)**, que quedan flanqueando la IS, en el ADN diana. La longitud de estas DR es de entre 2 y 14 pb y es característica para cada elemento (Partridge 2011).



I3.3.1.2. Transposones compuestos

Están constituidos por un grupo central de genes flanqueados por dos secuencias de inserción idénticas, un ejemplo de esta clase de transposones es el Tn5 (Reznikoff 2008). Su transposición es conservativa y las IS pueden transponerse de forma independiente o en bloque, incluido los genes de la región central (**Figura 7**).



Figura 7: Representación esquemática de un transposón compuesto.

I3.3.2. Transposones clase II

Comprenden los elementos de la familia Tn3 (Partridge 2011). Están constituidos por una transposasa, una resolvasa y genes de resistencia, todo ello flanqueado por dos secuencias IR. A la familia del Tn3 pertenece el transposón Tn4401, el cual transporta el gen *bla_{KPC}* (Figura 8).



Figura 8: Representación esquemática de un transposón clase II.

I3.4. Entorno genético de *bla_{KPC}*: Estructura del transposón Tn4401

Es un elemento móvil de 10 kb (kilobases). Está constituido por el gen *bla_{KPC}*, *tnpA* (transposasa), *tnpR* (resolvasa) y dos nuevas secuencias de inserción *ISKpn6* e *ISKpn7* (Naas *et al.* 2008) (Figura 9).

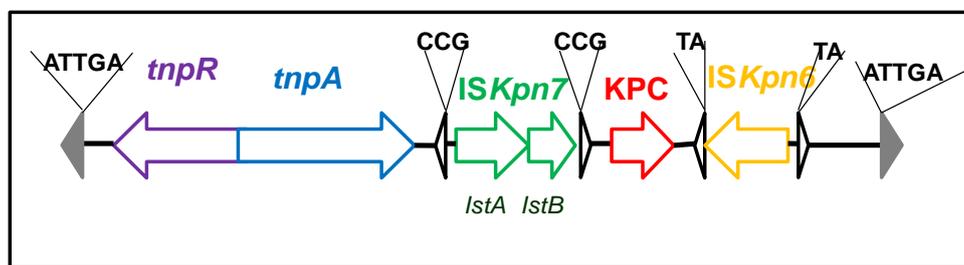


Figura 9: Representación esquemática del transposón Tn4401.

13.4.1. ISKpn6

Es una nueva secuencia de inserción perteneciente a la familia IS1182, de 1.540 pb de largo, probable transposasa. Se localiza corriente abajo del gen *bla*_{KPC} y se encuentra flanqueada por secuencias IR (*Inverted Repeats*) de 17 pb, siendo TA el sitio diana de duplicación (TSD) (Naas *et al.* 2008).

13.4.2. ISKpn7

Es un miembro de la familia IS21, se encuentra “corriente arriba” del gen *bla*_{KPC}. Tiene una longitud de 1.956 pb y codifica para *IstA* (probable transposasa) e *IstB* (proteína ayudante de la trasposición). Posee en los extremos secuencias IR de 28 pb de longitud, siendo la secuencia CCG el TSD (Naas *et al.* 2008).

13.4.3. *tnpA* y *tnpR*

TnpA es el gen (3.027 pb), responsable de codificar la transposasa, mutaciones del mismo pueden generar disminuciones en la frecuencia de transposición (Naas *et al.* 2008). *TnpR* codifica para la resolvasa (1.713 pb). Los genes *tnpA* y *tnpR* se transcriben divergentemente (Naas *et al.* 2008).

13.5. Diferentes entorno genético de *bla*_{KPC}

13.5.1. Variantes del transposón Tn4401

Hasta el momento se han identificado cinco isoformas del Tn4401. Las cuales se diferencian en el tamaño de delección, localizada entre *bla*_{KPC} e *IstB*. **Tn4401a** -99 pb; **Tn4401b** sin delección; **Tn4401c**, -215 pb; **Tn4401d**, -68 pb y **Tn4401e** -255 pb (**Figura 10**). Siendo dicha región altamente polimorfa y genéticamente inestable (Chen *et al.* 2014b).

13.5.2 Otras estructuras transportadoras de *bla*_{KPC} (NTE_{KPC})

Además de las variantes anteriormente mencionadas, se ha descrito la presencia del gen *bla*_{KPC} en elementos móviles, distintos al transposón Tn4401 (**Figura 10**) (Chen *et al.* 2014b). Dentro de los trabajos más relevantes podemos mencionar a Wei y col 2007, los cuales reportaron una cepa de *K. pneumoniae* (ZR01), cuyo transposón está constituido por una proteína diferente a *IstB* (ayudante de la transposición), denominada IS50 (Wei *et al.* 2007). A su vez Shen *et al.* (2009) evaluaron diferentes aislamientos clínicos de enterobacterias, en las cuales el principal entorno genético está constituido por remanentes

de los transposones Tn3 y Tn4401 (pKp048); Tn3-transposasa, Tn3-resolvasa, IS*Kpn8*, *bla*_{KPC-2} e IS*Kpn6*-like (IS*Kpn6* truncada). Se describen dos variantes de dicha estructura, la Variante 1 posee una *bla*_{TEM} truncada entre IS*Kpn8* y el gen *bla*_{KPC-2}. Asimismo en Colombia, se reportó un aislamiento de *P. aeruginosa* (pPA-2) con un nuevo entorno genético. El cual está compuesto por una *bla*_{TEM} truncada, *bla*_{KPC-2} e IS*Kpn6*-like.

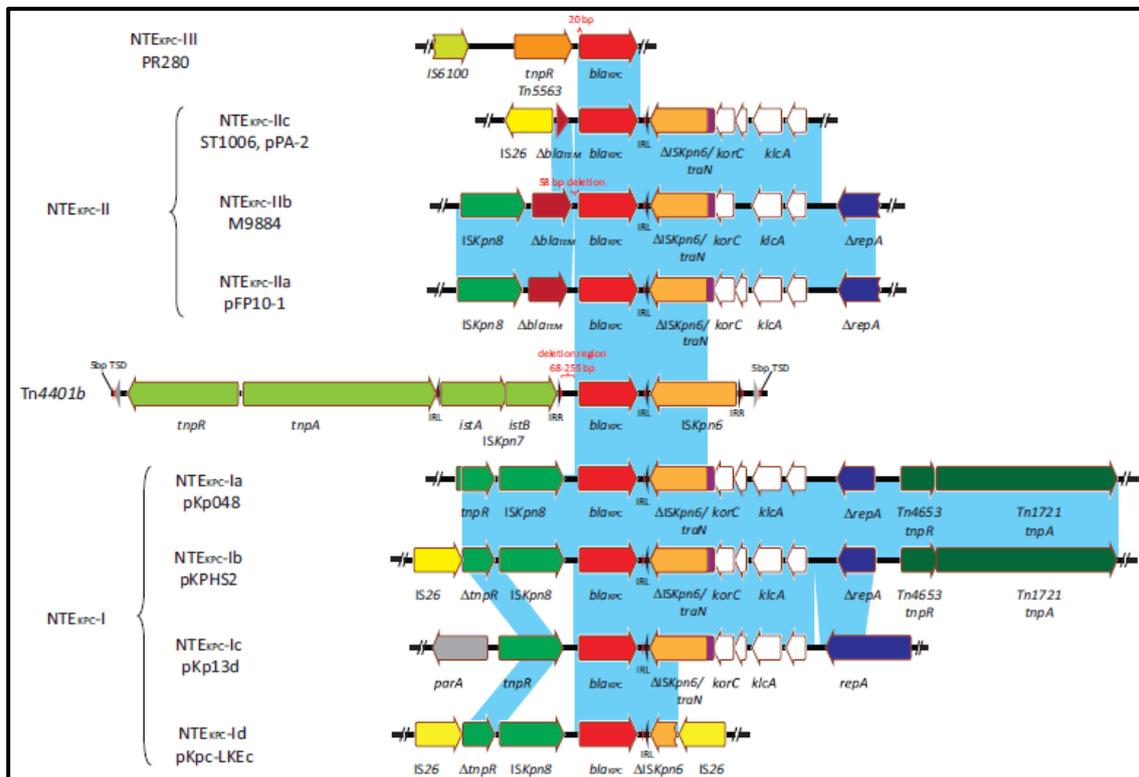


Figura 10: Diferentes estructuras transportadoras del gen *bla*_{KPC}. Tomado de Chen *et al.* (2014b).

13.6. Plásmidos portadores del transposón Tn4401

Los plásmidos que transportan el gen *bla*_{KPC} varían en: tamaño, capacidad de transferirse (tanto inter como intra especie), los genes de resistencia antibiótica que acarrean y el grupo de incompatibilidad al que pertenecen (Chen *et al.* 2014a). En cuanto a este último punto.

Se denomina plásmidos incompatibles, a aquellos que no pueden permanecer de forma estable en la misma célula, debido a que utilizan el mismo sistema de replicación y segregación de las copias. Esta característica de incompatibilidad permite su clasificación (Petersen 2011).

A su vez se existe una asociación entre las diferentes isoformas del Tn4401 y los diferentes plásmidos que acarrean el gen *bla*_{KPC} (plásmido pBK15692 con Tn4401b) (Chen *et al.* 2014b).

Los plásmidos mencionados anteriormente tienen la capacidad de transferirse entre diferentes especies de bacilos Gram negativos (Dortet, *et al.*, 2013), aunque presentan mayor afinidad por *K. pneumoniae* (Gales, *et al.*, 2012). Dicho microorganismo tiene la capacidad de diseminarse fácilmente por el ambiente hospitalario y producir brotes, por lo que es un importante vector de diseminación de determinantes de resistencia, como la carbapenemasa tipo KPC.

14. Epidemiología de *K. pneumoniae* productora de KPC en CEMIC

El Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas “Norberto Quirno” (CEMIC) es un hospital universitario que cuenta con dos unidades de cuidados intensivos (UCIs) y 160 camas de internación repartidas entre dos centros hospitalarios. En junio de 2009 se detectó en nuestra institución, el primer aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC, al cual denominamos “**caso índice**”. Desde enero del 2009 hasta abril del 2012, existieron períodos en los cuales se observaron incrementos en los aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de KPC, observándose períodos de mayor resistencia a los carbapenemes, tal como ocurrió en noviembre del 2009.

Durante este período también se aislaron otras especies de Enterobacterias productoras de KPC como *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* y *Escherichia coli*, además de dos aislamientos de *P. aeruginosa*, con altos niveles de resistencia a los carbapenemes, donde se identificaron los genes *bla*_{KPC}. A su vez en algunos pacientes se recuperaron diferentes especies de enterobacterias KPC (+) en forma simultánea (*K. pneumoniae* y *C. freundii* o *K. pneumoniae* y *E. cloacae*), esto nos lleva a pensar la posibilidad de que exista diseminación inter-especie.

Con el fin de conocer cómo se disemina este mecanismo de resistencia en nuestro nosocomio y aplicar medidas de control epidemiológico adecuadas, se evaluó la relación clonal de 17 aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC, obtenidos en ambos centros durante el período anteriormente mencionado (Arduino *et al.* 2010). Se define **Clon o grupo clonal** al grupo de aislamientos con un ancestro en común, cuya similitud entre es significativamente superior al que se encontraría entre aislamientos no relacionados de la misma especie seleccionados arbitrariamente (Didelot & Falush 2007).

La relación clonal se evaluó mediante **electroforesis de campo pulsado (PFGE)**, considerada la técnica de referencia o *Gold estándar* y **amplificación por PCR de secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (REP-PCR)**. Los estudios de REP-PCR y PFGE (**Figura 11 A y B**) mostraron una relación policlonal entre los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC, el brote estuvo constituido por 4 clones, con predominio de uno de ellos (Arduino *et al.* 2010). Este trabajo concluyó que este mecanismo de resistencia se transmitió en forma horizontal entre pacientes internados en ambos centros de nuestra institución.

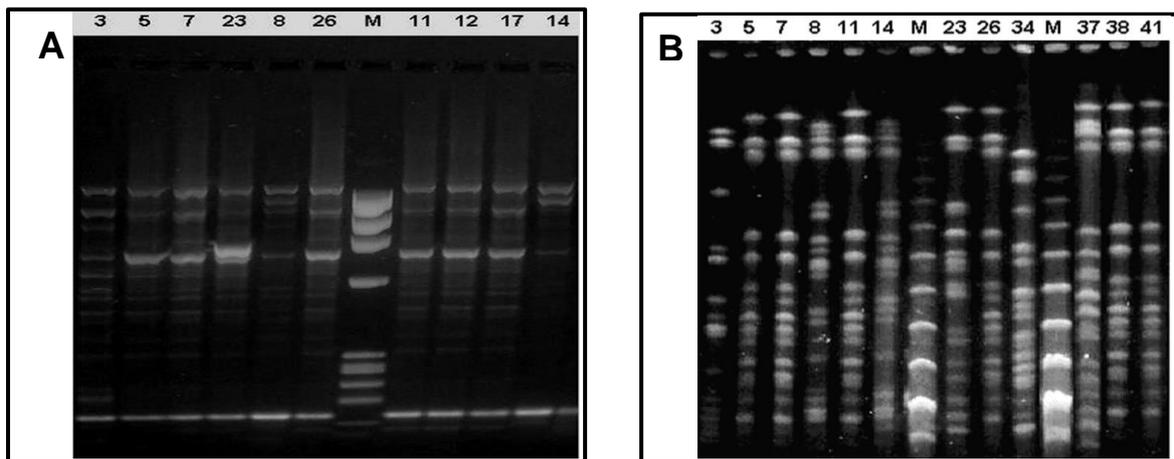


Figura 11: Relación clonal de aislamientos de *K. pneumoniae* (KPC (+)). (A) Gel de agarosa de la REP-PCR, mostrando el patrón de bandas de 10 de los aislamientos de *K. pneumoniae* KPC (+). **(B)** Gel de agarosa del PFGE correspondiente a 12 de los aislamientos de *K. pneumoniae* KPC (+).

Las conclusiones obtenidas de este trabajo fueron vitales para incorporar nuevas medidas de control epidemiológico, tal como la inclusión de *K. pneumoniae* productora de KPC en los cultivos de vigilancia semanales realizados a los pacientes internados en las UCIs. Los portadores de *K. pneumoniae* productora de KPC, son un importante reservorio de este microorganismo y su detección temprana disminuye notablemente los porcentajes de colonización y/o infección (Ben-David *et al.* 2010), por lo cual un resultado positivo en la portación es indicación de aislamiento del paciente (Akova *et al.* 2012).

La Mortalidad atribuible a infecciones por agentes productores de KPC es más del 50%. Las enterobacterias productoras de KPC son multiresistentes y presentar sensibilidad a escasos antibióticos, los cuales no siempre son una opción terapéutica: Tigeciclina no puede ser utilizado en bacteriemias, colistina y gentamicina son nefrotóxicos. A su vez es conveniente no utilizar monoterapias ya que presentan peor sobrevida, dificultando la elección de esquemas terapéuticos (Dortet *et al.* 2013).

I5 Epidemiología de *P. aeruginosa* productora de KPC en nuestra institución

El 16 de julio del 2010 se aisló de un urocultivo una *P. aeruginosa* multiresistente, la cual presentaba una inhibición con ácido borónico (300 µg) dudosa. Si bien dicho método no es el adecuado para la búsqueda de KPC en Pae, en ese momento no se contaba con otra metodología. La presencia de dicha carbapenemasa se confirmó por amplificación del gen *bla*_{KPC}.

La resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa* es causada por una sumatoria de mecanismos, lo cual genera dificultades metodológicas al momento de determinar fenotípicamente cual de él/ellos es responsable de la resistencia. La inhibición con ácido borónico (300 µg) utilizado para la detección fenotípica de KPC en *K. pneumoniae*, también inhibe la cefalosporinasa cromosómica (AmpC), no pudiéndose discriminar entre ambos mecanismos e invalidando el uso de esta metodología como único *test* de *screening* en Pae. En consecuencia, se ha propuesto la combinación de varios *test*, entre ellos: inhibición con ácido borónico en mayor concentración (600 µg), inhibición con cloxacilina (inhibidor específico de AmpC) y Hodge modificado para la detección fenotípica de KPC en *P. aeruginosa* (Pasteran *et al.* 2011a; Pasteran *et al.* 2011b).

La rápida diseminación de las carbapenemasas tipo KPC, así como la dificultad en su detección fenotípica en *P. aeruginosa*, hacen que este mecanismo pase muchas veces inadvertido en la rutina diaria del laboratorio clínico. Además es vital determinar si el mecanismo de resistencia involucrado es cromosómico o plasmídico, desde el punto de vista epidemiológico y para poder instaurar tratamientos empíricos adecuados.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



HIPÓTESIS

H1. El transposón Tn4401 se encuentra en un plásmido que se disemina preferentemente en enterobacterias y en menor medida en *P. aeruginosa*. Por lo que un solo clon adquirió dicho plásmido y se diseminó exitosamente entre ambos centros de nuestra institución. Es decir que existe una relación clonal entre los aislamientos de *P. aeruginosa* productores de KPC.

H2. *P. aeruginosa* adquirió este mecanismo de resistencia luego de la aparición del caso índice de *K. pneumoniae* productora de KPC.

OBJETIVOS

- O1.** Determinar si la carbapenemasa tipo KPC se halla presente en aislamientos de *P. aeruginosa* previos al brote de *K. pneumoniae* productora de KPC.

- O2.** Determinar si la resistencia a los carbapenemes en los aislamientos de *P. aeruginosa* post caso índice, se debe a elementos transferibles.

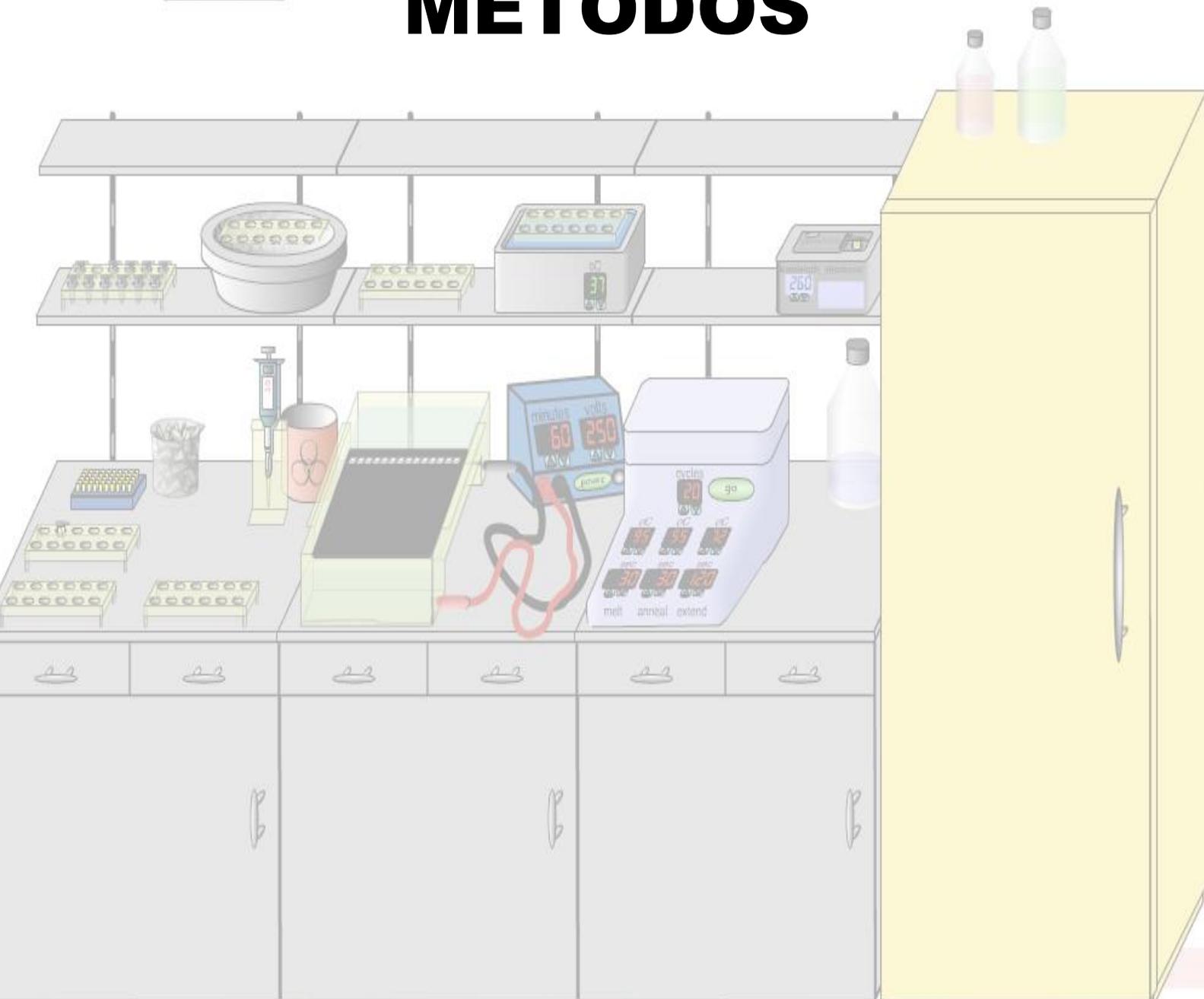
- O3.** Estudiar la relación clonal entre los aislamientos de *P. aeruginosa* productores de KPC.

- O4.** Evaluar métodos de *screening* para detectar la carbapenemasa tipo KPC en *P. aeruginosa*.

MATERIALES

Y

MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

M1. Medios de cultivo y de conservación

M1.1. Caldo Glicerol 20%

Como método de conservación de las bacterias se utilizó el almacenamiento en glicerol al 20% que permite mantener la viabilidad de los organismos durante varios años a -80 °C.

Su composición en g/L es:

• Caldo cerebro, corazón (Britania)	52
• Glicerol	200
• Agua destilada	800

Preparación: Se disuelve 52 g del caldo en agua destilada, calentar hasta su completa disolución. Agregar el glicerol y esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Distribuir 2 mL en criotubos y conservar a -80 °C.

M1.2. Agar sangre humana al 5% (AS)

Medio de cultivo nutritivo utilizado para el crecimiento de diversos microorganismos, al ser suplementado con sangre permite el crecimiento de bacterias exigentes.

Su composición en g/L es:

• Agar base Columbia (Britania)	40
• Agua destilada	950
• Sangre humana desfibrinada	50

Preparación: Disolver el agar base en el agua destilada, calentar hasta disolución total. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121 °C. Enfriar a 45-50 °C. Agregar la sangre desfibrinada y homogeneizar. Distribuir en placas de Petri.

M1.3. Agar Muller Hilton (AMH)

Medio con concentraciones estandarizadas de CaCl_2 , MgCl_2 y ZnCl_2 para obtener resultados fiables de sensibilidad a agentes antimicrobianos mediante el método de difusión en agar.

Su composición en g/L es:

- Agar base Columbia (Britania) 21
- Agua destilada 1.000

Preparación: Disolver el agar base en el agua destilada, calentar hasta disolución total. Ajustar el pH a $7,3 \pm 0,1$ ($25\text{ }^\circ\text{C}$). Esterilizar en autoclave a $116\text{-}121\text{ }^\circ\text{C}$, durante 10-15 minutos. Distribuir de 25-30 mL del medio en placas de petri estériles de 9 cm de diámetro, con el fin de obtener un espesor de 4mm.

M1.4. Caldo BHI (Infusión cerebro corazón)

Medio altamente nutritivo, recomendado para el enriquecimiento de microorganismos exigentes.

Su composición en g/L es:

- Caldo cerebro, corazón (Britania) 52
- Agua destilada 1.000

Preparación: Disolver 52 gr de caldo en agua destilada, calentar hasta su completa disolución. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a $121\text{ }^\circ\text{C}$.

M1.5. Caldo MH (Muller Hinton)

Medio estandarizado para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los microorganismos frente a los antimicrobianos.

Su composición en g/L es:

- Caldo Muller Hinton (Britania) 22
- Agua destilada 1.000

Preparación: Disolver 22 g del caldo en agua destilada, calentar hasta su completa disolución. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a $121\text{ }^\circ\text{C}$.

M2. Soluciones y Geles

M2.1. Gel de agarosa al 1,2%

Su composición en g/100mL es:

- | | |
|--|-----|
| • Agarosa (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) | 1,0 |
| • Agua destilada | 100 |

Preparación: Calentar en microondas hasta que se disuelva la agarosa. Dejar enfriar. Una vez tibio, adicionar 5 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL).

M2.2. TBE (Tris, Borato, EDTA) x 0,5

Composición del TBE x 20 en g/L es:

- | | |
|---|-------|
| • Tris-base (Tris-(hidroximetil)-aminometano, Biorad) | 108 |
| • Ácido Bórico (JT. Baker) | 55 |
| • Na ₂ EDTA-H ₂ O (Invitrogen) | 9,3 |
| • Agua tridestilada destilada | 1.000 |

Preparación: Disolver el Tris base, ácido bórico y EDTA en 750 mL de agua tridestilada. Colocar en agitación hasta disolución total (EDTA puede tardar en disolverse, aplicar calor puede facilitar la disolución). Una vez disuelto llevar a 1.000 mL. Ajustar el pH a 8,3 por adición de HCl concentrado. Disolver 50 mL del TBE x 20 en 2.000 mL, siendo la concentración final x 0,5.

M3. Análisis de los niveles de resistencia y perfiles fenotípicos más frecuentes de *P. aeruginosa* en nuestra institución

M3.1. Características de las cepas bacterianas utilizadas

Se realizó un análisis retrospectivo sobre datos de sensibilidad, los cuales se obtuvieron mediante el Sistema Informático de Resistencia (SIR), de la Sub-comisión de Antimicrobianos de SADEBAC-AAM.

Se analizaron los datos correspondientes a 1.216 aislamientos únicos de *P. aeruginosa*, obtenidos de pacientes internados en nuestro hospital.

Se evaluaron dos períodos de tiempo. El primero de ellos comprende desde el 2000 al 2004, incluyendo 562 aislamientos y el segundo período del 2005 al 2008, con 654 aislamientos.

M3.2. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el *test* estadístico “chi2”. Utilizando el software infostat versión 2014e, <http://www.infostat.com.ar/>.

M3.3. Consumo anual de imipenem y meropenem

El consumo anual de imipenem y meropenem para el período 2002-2007 se determinó utilizando la siguiente fórmula (Goldstein *et al.* 2009).

$$\text{DDD/pacientes día} \times 1.000$$

DDD: Dosis promedio por día correspondiente a la principal indicación de un fármaco en adultos, estandarizada por el centro colaborador de la OMS. La DDD tanto para imipenem como para meropenem es de 2 g (WHO 2014).

M4. Detección de *P. aeruginosa* productora de KPC

M4.1. Amplificación del gen *bla*_{KPC} por Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR)

M4.1.1. Características de las cepas bacterianas utilizadas

El estudio realizado fue de carácter retrospectivo, las cepas fueron obtenidas de una colección de microorganismos pertenecientes a nuestra institución. Se utilizaron 114 aislamientos únicos, clínicamente significativos de *P. aeruginosa*, provenientes de pacientes internados en CEMIC (**Tabla 2**).

El período evaluado fue subdividido en dos. Se consideró como punto de inflexión, el primer caso de *K. pneumoniae* productora de KPC proveniente de un paciente internado en nuestra institución (caso índice). El primer período abarca desde enero del 2005 hasta junio del 2009, e incluye 37 aislamientos. El segundo período comprende desde julio del 2009 hasta abril del 2012, con 77 aislamientos.

Se consideró como criterio de inclusión, la resistencia a imipenem y meropenem (halo de inhibición ≤ 15 cm).

Las cepas seleccionadas fueron crecidas en AS a 37 °C.

Material Clínico	Período	
	Enero-2005 a Junio-2009 (pre caso índice). N =37	Julio-2009 a Abril-2012 (post caso índice) N=77
Respiratorios	21	28
Heridas y Biopsias	6	16
Orinas	6	18
Hemocultivos y Catéteres	4	15

Tabla 2: Distribución de los aislamientos de *P. aeruginosa* de acuerdo a su origen.

M4.1.2. Extracción en crudo de ADN o *Boiling*

Se colocaron 50 μL de agua destilada estéril en microtubos y se adicionaron de 2 a 3 colonias hasta obtener un 0,5 Mc Farland. Se calentó la suspensión bacteriana en el termociclador (Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700). Posteriormente, se centrifugo a 14.000 rpm por 10 minutos y se separó el sobrenadante, el cual se puede utilizar directamente para la PCR o ser almacenarlo a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

M4.1.3. Mezcla de los componentes (Mix)

Mix (volumen total de 25 μL)

ADN	5,0 μL
<i>Buffer</i> (5X Green GoTaq®, Promega)	5,0 μL
dNTPs (10 mM de cada dNTP, Genbiotech)	0,4 μL
<i>Primer</i> KPC-R (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}^{-1}$, Genbiotech)	0,75 μL
<i>Primer</i> KPC-F (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}^{-1}$, Genbiotech)	0,75 μL
<i>Go Taq polymerase</i> (5 $\text{U}/\mu\text{L}^{-1}$, Promega)	0,15 μL
Agua pura grado PCR	13 μL

M4.1.4. Primers

Designación	Secuencia (5'→3')	Uso	Referencia
KPC-R	CGTTGTCATCCTTGTTAG	Amplificación del gen <i>bla</i> _{KPC}	Yigit <i>et al.</i> (2001)
KPC-F	CCGTCTAGTTCTGCTGTC		

Tabla 3: Descripción de los oligonucleótidos utilizados en la amplificación del gen *bla*_{KPC}.

M4.1.5. Amplificación de ADN

La amplificación del gen *bla*_{KPC} se llevó a cabo en el termociclador, *Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700*.

Condiciones de amplificación

1 ciclo inicial	5 min. a 95 °C (desnaturalización)
36 ciclos consistentes en:	1 min. a 95 °C (desnaturalización)
	30 seg. a 53 °C (<i>annealing</i>)
	1 min a 72 °C (extensión)
Extensión final de un ciclo:	10 min a 72 °C.

M4.1.6. Electroforesis en gel de agarosa

Condiciones de la corrida electroforética: Gel de agarosa al 1% (apartado **M2.1**), *buffer* de corrida TBE x 0,5 (apartado **M2.2**) y un voltaje de 5 voltios/cm, durante 3 h. El marcador de peso molecular fue de 100 pb ADN (Genbiotech).

M4.1.7. Control de calidad

Dentro del estudio se incluyó como control positivo, el primer aislamiento de *K. pneumoniae* productor de KPC de nuestro hospital (caso índice). El cual fue previamente caracterizado tanto fenotípica como molecularmente.

M4.1.8. Visualización de resultados

Una vez finalizada la corrida electroforética, se colocó el gel en el transiluminador de luz ultravioleta (UVP, Ultraviolet transilluminator). La presencia de una banda de 800 pb evidencia la amplificación del gen *bla_{KPC}*.

M4.1.9. Análisis de secuencias

El producto de amplificación fue secuenciado por *Macrogen* (Corea). El análisis de secuencias se realizó mediante el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), www.ncbi.nlm.nih.gov/.

M5. Estudio de sensibilidad

Una vez determinada la presencia o ausencia del gen *bla_{KPC}*, se decidió estudiar los perfiles de resistencia de las cepas de *P. aeruginosa* productoras de KPC con respecto a los aislamientos no productores. Para ello se utilizaron los métodos de **difusión por discos** y **dilución en agar**.

M5.1. Cepas bacterianas utilizadas

Se incluyeron dentro del estudio de sensibilidad 34 aislamientos de *P. aeruginosa* productores de KPC, obtenidos durante el segundo período analizado (post caso índice). A su vez se incluyeron 43 aislamientos negativos del mismo período, evaluándose un total de 77 aislamientos crecidos en AS a 37 °C.

M5.2. Método de difusión por discos

A partir de los subcultivos en AS, se realizaron suspensiones bacterianas equivalentes a un estándar 0,5 Mc Farland ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL). Con un hisopo estéril embebido en el inóculo bacteriano se sembró la placa de AMH, de manera de obtener un crecimiento confluyente y se depositaron los discos de los diversos antimicrobianos evaluados sobre la superficie del agar (Bauer *et al.* 1966). Estos procedimientos se realizaron siguiendo las recomendaciones del CLSI (2013).

Los antibióticos utilizados en este estudio son los recomendados por la Sociedad Argentina de Bacteriología (SADEBAC) para *P. aeruginosa*, los cuales se detallan a continuación: aztreonam (10 µg/disco), piperacilina/tazobactam (100/10 µg/disco), ceftazidima (30 µg/disco), cefepime (30 µg/disco), imipenem (10 µg/disco), meropenem (10 µg/disco), ciprofloxacina (5 µg/disco), gentamicina (10 µg/disco), amikacina (30 µg/disco) y colistina (10 µg/disco). Todos los antibióticos utilizados corresponden a la marca Oxoid (Basingstoke, UK).

Las placas de AMH fueron incubadas a 37 °C, entre 16-18 h. La lectura se realizó midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos. Para determinar la susceptibilidad o resistencia a los mismos, se comparan las lecturas obtenidas con los puntos de corte recomendados por el CLSI (2013).

M5.3. Método de dilución en agar

Mediante esta técnica se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) a los antibióticos imipenem (Imi), meropenem (Mero), ceftazidima (Caz) y cefepime (Cef).

M5.3.1. Preparación de las soluciones *stock*

Se disolvió 1 g de antibiótico en 10 mL de solvente (100.000 µg/mL). Se diluyó 1 mL de la solución en 9 mL del diluyente (10.000 µg/mL). Finalmente a 4 mL de la nueva dilución se le agregó 11,6 mL de solvente (2.560 µg/mL) (**Tabla 4**).

Antibiótico	Solvente	Diluyente
Imipenem	Buffer fosfato/ pH: 7.2/ 0,01 mol/L	Buffer fosfato/ pH: 7.2/ 0,01 mol/L
Meropenem	Agua destilada	Agua destilada
Ceftazidima	Agua destilada	Agua destilada
Cefepime	Buffer fosfato/ pH: 6.0/ 0,1 mol/L	Buffer fosfato/ pH: 6.0/ 0,1 mol/L

Tabla 4: Soluciones solvente y diluyente de las drogas estudiadas por el método de dilución en agar. Tomado de (CLSI 2013).

A partir de la solución *stock*, se hicieron diluciones al 1:2 en forma seriada (**Tabla 5**). A 9 mL de AMH se le adiciono 1 mL de dilución, se homogenizo y plaqueo.

Paso	Concentración (µg/mL)	Fuente	Volumen	Diluyente	Concentración intermedia (µg/mL)	Concentración final en el AMH (µg/mL)
1	2.560	<i>Stock</i>	-	-	2.560	-
2	2.560	<i>Stock</i>	2	2	1.280	128
3	2.560	<i>Stock</i>	1	3	640	64
4	640	Paso 3	2	2	320	32
5	640	Paso 3	1	3	160	16
6	640	Paso 3	1	7	80	8
7	80	Paso 6	2	2	40	4
8	80	Paso 6	1	3	20	2
9	80	Paso 6	1	7	10	1
10	10	Paso 9	2	2	5	0.5
11	10	Paso 9	1	3	2.5	0.25

Tabla 5: Esquema de diluciones seriadas del método de CIM. Tomado de (CLSI 2013).

M5.3.2. Preparación del Inóculo

A partir de los subcultivos en AS, se realizaron suspensiones bacterianas equivalentes a un estándar 0,5 Mc Farland. La suspensión bacteriana se diluyó 1:10 ($1 \cdot 10^7$ UFC/mL). Se colocó una alícuota de 1.000 μ L en el pocillo del replicador, el cual dispensa entre 2-4 μ L, siendo el inóculo final en el AMH con antibiótico de aproximadamente $1 \cdot 10^4$ UFC/mL por *spot*.

M5.3.3. Control de calidad

Dentro del estudio de sensibilidad se incluyeron dos cepas control: *E. coli American Type Culture Collection (ATCC) 25922* y *P. aeruginosa ATCC 27853*, De las cuales se conoce su patrón de resistencia o sensibilidad, y se han establecidos los rangos de los halos de inhibición (CLSI 2013). Si el diámetro del halo correspondiente a la cepa control está dentro de este rango, entonces el control de calidad es aceptado.

M5.3.4. Lectura e interpretación de la CIM

Se define como CIM a la menor concentración de agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano, se expresa en μ g/mL. Para determinar la susceptibilidad o resistencia al antibiótico evaluado, se comparan los valores obtenidos de CIM con los puntos de corte recomendados por el CLSI (2013).

M6. Evaluación del entorno genético del gen *bla*_{KPC} por PCR

Con la finalidad de determinar cuál es la variante del transposón que acarrea el gen *bla*_{KPC} en nuestros aislamientos de *P. aeruginosa*, se realizó la técnica de mapeo por PCR. Se analizaron las secuencias obtenidas a partir de una serie de reacciones de PCR. Cuyas secuencias *target* se solapan y cubren casi la totalidad de la estructura del transposón, permitiéndonos su análisis (**Figura 12**).

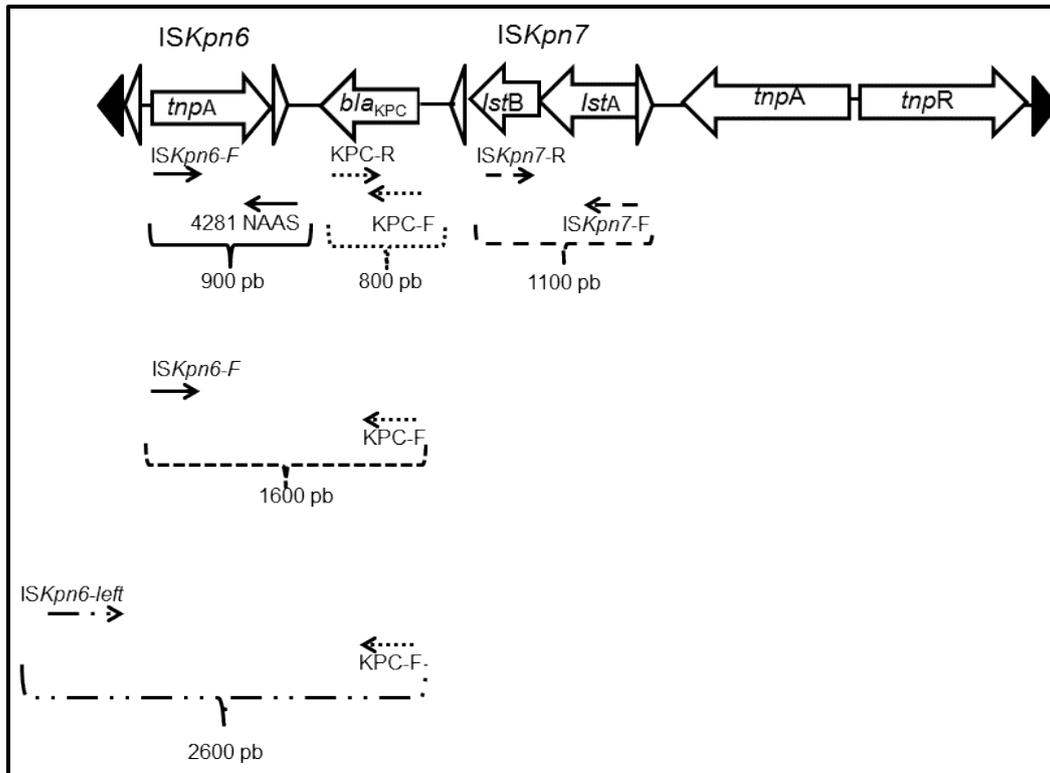


Figura 12: Esquema del transposón Tn4401. Las flechas indican de forma aproximada la ubicación de los *primers* utilizados en el estudio genético.

M6.1. Cepas bacterianas utilizadas

Aislamientos de *P. aeruginosa* productores de KPC, denominadas 318628 y 11716.

M6.2. Extracción en crudo de ADN o *Boiling*

El protocolo de extracción utilizado, se describe en el apartado **M4.1.2.**

M6.3. Mezcla de los componentes (Mix)

Con respecto a la mix del apartado **M4.1.3.**, solamente se modificó la clase de *primers* utilizados (**Tabla 6**).

M6.4. Primers

Designación	Secuencia (5'→3')	Uso	Referencia
ISKpn6-F	CTACAACGGGTACACAGC		Esta Tesis
4281 NAAS	GGCACGGCAAATGACTA		Naas <i>et al.</i> (2008)
ISKpn6 left	CAATAGTTCGTCCAGGTC		Esta Tesis
ISKpn7-F	CGAGGACTTCAGCTTCAC	Mapeo por PCR	Esta Tesis
ISKpn7-R	CGTACACACCGATGGAGC		Esta Tesis
KPC-R	CGTTGTCATCCTTGTTAG		Yigit <i>et al.</i> (2001)
KPC-F	CCGTCTAGTTCTGCTGTC		

Tabla 6: Descripción de los oligonucleótidos utilizados en el estudio del entorno genético.

M6.5. Amplificación de ADN

El protocolo de amplificación utilizado, se describe en el apartado **M4.1.5**.

M6.6. Electroforesis en gel de agarosa y Visualización de resultados

Descrita en los apartados **M4.1.6**. y **M4.1.7**.

M6.7 Análisis de secuencias

El producto de amplificación fue secuenciado por *Macrogen*. Mediante el programa informático *Unipro Unigen 1.14.1*, se evaluó la calidad de los cromatogramas obtenidos. Se eliminaron las secuencias que presentaban superposición de picos, y se recortaron las zonas del cromatograma con picos de baja definición y/o mucho ruido de fondo. Se alinearon las secuencias purificadas en el programa *Vector NTI advance 11.5.1*, obteniéndose una secuencia consenso o *conting*. Posteriormente se comparó el *conting* con las secuencias del transposón reportadas en la literatura. Los números del *GeneBank*

correspondientes a las cepas utilizadas en el alineamiento son: EU176012.1 (pBC633), EU176014.1 (pBC2303), EU176013.1 (pCOL1), EU176011.1 (pNYC), DQ989640, HM769262 y JN545009 (PA-2).

M7. Estudio de la relación clonal de *P. aeruginosa* productora KPC

Existen distintas técnicas que permiten evaluar la relación clonal, siendo el *Gold standar* la electroforesis de campo pulsado (PFGE). Debido a su elevado poder de discriminación y excelente reproducibilidad, sin embargo presenta como desventajas ser una técnica larga y laboriosa. En el PFGE el ADN genómico es digerido con enzimas de restricción generándose fragmentos de elevado peso molecular, los cuales son separados en un gel de agarosa, gracias a la aplicación de campos eléctricos cuya direccionalidad cambia a intervalos predeterminados.

El patrón de bandas generado es analizado mediante programas específicos como *Diversity Database Fingerprinting Software* (Bio-Rad) y Los electrocariotipos se incorporan a una base de datos de referencia, la cual permite la comparación inter-laboratorio. Al comparar patrones de bandas, es necesario enfatizar en la estandarización de ciertos puntos críticos como preparación del ADN, enzima de restricción y dirección e intensidad del voltaje (Goering 2010).

Este método es altamente discriminatorio. Detecta pequeñas variaciones, las cuales se acumulan rápidamente en el genoma bacteriano, marcando con escaso margen de error la existencia de una conexión epidemiológica entre los aislamientos estudiados. Esta cualidad les permite evaluar eficazmente la relación clonal dentro de un brote intra-hospitalario (Vazquez & Berron 2004). Sin embargo, esa misma capacidad es una desventaja a la hora de establecer líneas clonales entre diferentes países y/o décadas. Dificultando detectar la adquisición de mecanismos de resistencia y/o incremento de la virulencia por parte de los clones estudiados.

M7.1. Amplificación por PCR de secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (REP-PCR)

La REP-PCR es otra técnica de tipificación, la cual utiliza *primers* que amplifican secuencias repetidas palindrómicas extragénicas, distribuidas a lo largo del cromosoma bacteriano (**Figura 13**). El polimorfismo del patrón de bandas dependerá de la variedad en la distribución de las repeticiones y de la distancia entre las mismas, causada por inserciones o deleciones. Si bien la REP-PCR presenta menor poder resolutivo que el PFGE, tiene un alto poder discriminatorio y presenta como ventaja ser más simple, rápida y con menor costo (Fernández-Cuenca 2004; Syrmis *et al.* 2004; Kidd *et al.* 2011).

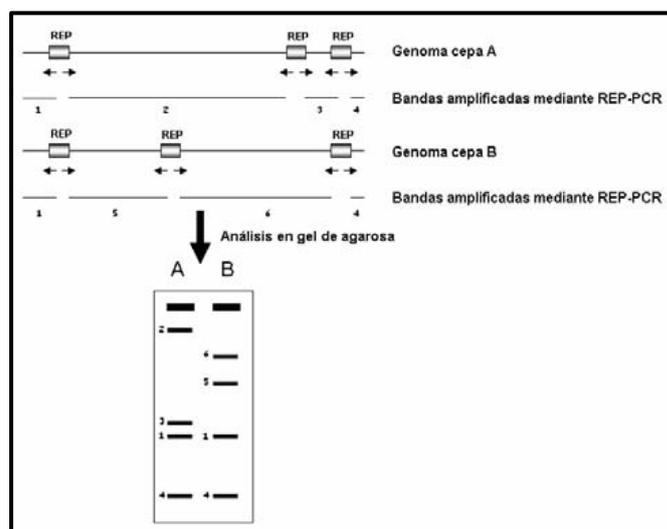


Figura 13: Diagrama esquemática de la REP-PCR. Tomado de Vílchez and Alonso (2009).

M7.1.1. Cepas bacterianas estudiadas

Se evaluó la relación clonal existente entre los 34 aislamientos de *P. aeruginosa* productores de KPC, obtenidos durante el segundo período analizado (post caso índice). A su vez se incluyeron en este estudio cuatro aislamientos productores de metalo- β -lactamasas detectadas durante el análisis de sensibilidad (7072, 12-014, 12-015, 12-236) y una cepa resistente a colistina proveniente de nuestro cepario (11-1680).

M7.1.2. Extracción en crudo de ADN o *Boiling*

El protocolo de extracción utilizado, se describe en el apartado **M4.1.2.**

M7.1.3. Mezcla de los componentes (Mix)

Mix (volumen total de 50 μL)

ADN	5,0 μL
Buffer (5X Green GoTaq $\text{\textcircled{R}}$, Promega)	10,0 μL
dNTPs (10 mM de cada dNTP, Genbiotech)	0,5 μL
Rep-1 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}^{-1}$, Genbiotech)	9,0 μL
Rep-2 (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}^{-1}$, Genbiotech)	9,0 μL
Go Taq polymerase (5 U/ μL^{-1} , Promega)	0,25 μL
Agua pura grado PCR	11,25 μL
Dimetil Sulfoxido	5,0 μL

M7.1.4. Primers

Designación	Secuencia (5'→3')	Uso	Referencia
REP-1	IIICGICGICATCIGGC	Relación clonal	Snelling <i>et al.</i> (1996)
REP-2	ICGICTTATCIGGCCTAC		

Tabla 7: Descripción de los oligonucleótidos utilizados en la REP-PCR.

M7.1.5. Amplificación de ADN

Se utilizó el termociclador de *Applied Biosystems*® GeneAmp® PCR System 9700.

Condiciones de amplificación

1 ciclo inicial	5 min. a 95 °C(desnaturalización)
45 ciclos consistentes en:	1min. a 95 °C (desnaturalización)
	1 min. a 42 °C (<i>annealing</i>)
	8 min a 65 °C (extensión)
Extensión final de un ciclo:	10 min a 65 °C.

M7.1.6. Electroforesis en gel de agarosa y Visualización de resultados

Descrita en los apartados **M4.1.6. y M4.1.7.**

M7.1.7. Interpretación de resultados

Los patrones de bandas obtenidos en la REP-PCR fueron interpretados visualmente de acuerdo a los criterios propuestos por Tenover *et al.* (1995). Según los cuales se debe considerar como indistinguibles, cuando no presenten diferencias en todas las bandas; cercanamente relacionadas, las cepas que presenten 2 ó 3 fragmentos diferentes; posiblemente relacionadas a las cepas con diferencias en 4-6 bandas; mientras que aquellas con 7 ó más bandas diferentes, son consideradas como no relacionadas.

M7.2. Multilocus Sequence Typing (MLST)

A diferencia de las metodologías anteriormente descritas, esta técnica se basa en el análisis de secuencias nucleotídicas cuidadosamente seleccionadas. Son fragmentos corta longitud (450-500 pb), los cuales presentan una alta variabilidad combinada, proporcionando un alto grado de discriminación (**Figura 14**). A su vez son genes *housekeeping*, es decir que codifican enzimas metabólicas muy conservadas, y no están sometidos a presión selectiva como ocurre con los factores de virulencia o genes ribosomales. De esta manera permiten detectar variaciones neutras y definir líneas clonales relativamente estables geográfica y/o temporalmente (Vazquez & Berron 2004).

Cada variante es definida como "variante alélica" y los diferentes alelos de cada uno de los genes conforman el perfil alélico o secuenciotipo (ST). Al analizar secuencias los resultados obtenidos son objetivables, a su vez esta metodología está altamente estandarizada y existen bases de datos. Permitiendo la comparación de los perfiles o secuencias tipo obtenidos en diferentes laboratorios. Aunque esta técnica presenta como desventaja ser muy costosa.

Debido a sus características, esta metodología es una excelente herramienta a la hora de hacer estudios epidemiológicos globales (multicéntricos o intercontinentales) y cuando se requiere comparar diferentes períodos de tiempo. Permitiendo el seguimiento de clones multi-resistentes. Sin embargo la investigación de brotes hospitalarios a menudo representan un lapso temporal corto, por lo en estos casos el MLST presenta menor resolución que PFGE y REP-PCR, las cuáles están basados en variaciones más rápidas del genoma (Foxman *et al.* 2005; Singh *et al.* 2006).

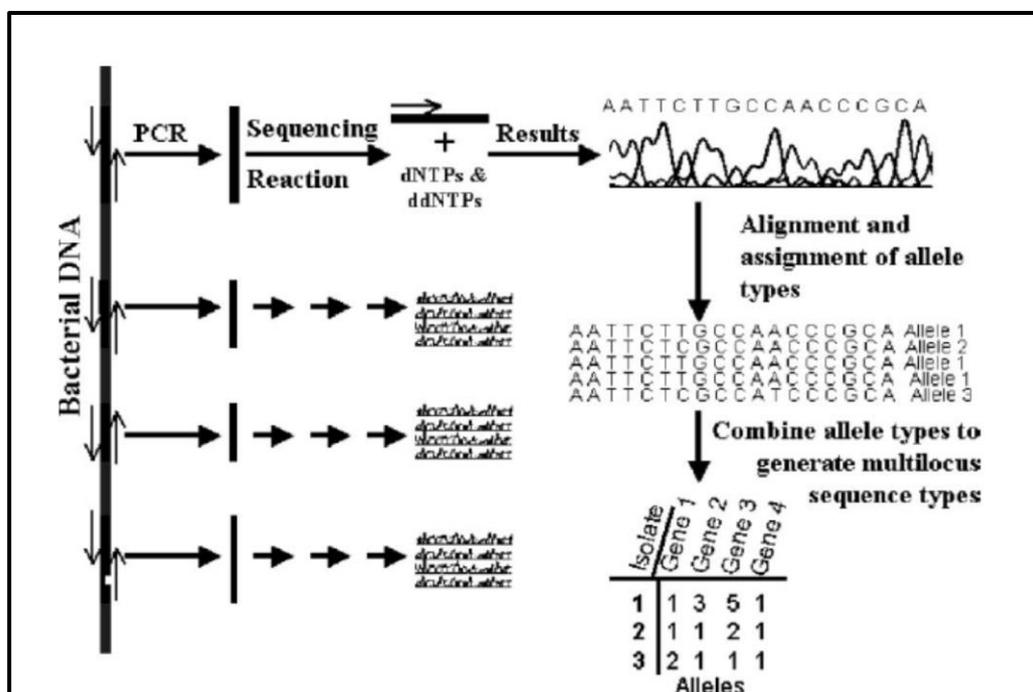


Figura 14: Diagrama esquemática de MLST. Tomado de Singh *et al.* (2006).

M7.2.1. Cepas bacterianas estudiadas

Se determinó el secuenciotipo del primer aislamiento de *P. aeruginosa* productor de KPC detectado por PCR (318628) Y la única cepa de *P. aeruginosa* KPC (+) resistente a colistina (12-1201), evidenciada durante el análisis de sensibilidad.

M7.2.2. Extracción de ADN por QIAamp DNA Mini Kit

- Adicionar 25 μ L de un inóculo bacteriano denso a 9 mL de caldo BHI.
- Incubación *overnight*.
- Centrifugar a 5.000 x g (7.500 rpm), durante 10 min.
- Resuspender el pellet en 200 μ L del ATL (*Tissue Lysis Buffer*).
- Incubar a 37 °C por 30 min.
- Adicionar 20 μ L de proteinasa K (600 mAU/mL).
- Incubar a 56 °C por 30 min, en agitación.
- *Spin down*.
- Adicionar 1 μ L de Rnasa A (10mg/mL, 7.000U/mL).
- Incubar 2 min. a temperatura ambiente.
- *Spin down*.
- Adicionar 200 μ L de AL (*Lysis Buffer*).
- Agitar vigorosamente (*vortex*) por 1 min.
- Incubar a 70 °C por 10 min.
- Adicionar 200 μ L de etano al 96-100%.
- Agitar vigorosamente (*vortex*) por 1 min.
- Trasvasar con pipeta la mezcla a la columna.
- Centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm), durante 1 min.
- Descartar el contenido de la columna.
- Adicionar 500 μ L de AW1 (*Wash Buffer 1*).
- Centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm), durante 1 min.
- Descartar el contenido de la columna.
- Adicionar 500 μ L de AW2 (*Wash Buffer 2*).
- Centrifugar a 20.000 x g (14.000 rpm), durante 3 min.
- Cambiar el tubo y Centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm), durante 1 min.
- Adicionar 100 μ L de *buffer* de elución AE (10 mM Tris·Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0).
- Centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm), durante 1 min.

M7.2.3. Mezcla de los componentes (Mix)

Mix (volumen total de 25 μL)

ADN	2,0 μL
<i>Buffer</i> (5X Green GoTaq $\text{\textcircled{R}}$, Promega)	5,0 μL
dNTPs (10 mM de cada dNTP, Genbiotech)	0,5 μL
<i>Primer-1</i> (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}^{-1}$, Genbiotech)	1,0 μL
<i>Primer-2</i> (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}^{-1}$, Genbiotech)	1,0 μL
<i>Go Taq polimerase</i> (5 $\text{U}/\mu\text{L}^{-1}$, Promega)	0,15 μL
Agua pura grado PCR	15,35 μL

M7.2.4. Primers

Designación	Secuencia (5'→3')	Tamaño del amplicon (pb)	Referencia
<i>acsA-1</i>	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	842	Todos los <i>primers</i> mencionados en esta tabla fueron descritos por (Curran <i>et al.</i> 2004)
<i>acsA-2</i>	GACATAGATGCCCTGCCCCTTGAT		
<i>aroE-1</i>	ATGTCACCGTGCCGTTCAAG	495	
<i>aroE-2</i>	TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG		
<i>guaA-1</i>	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	940	
<i>guaA-2</i>	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA		
<i>mutL-1</i>	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	940	
<i>mutL-2</i>	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC		
<i>nuoD-1</i>	ACCGCCACCCGTA CTG	1.042	
<i>nuoD-2</i>	TCTCGCCCATCTTGACCA		
<i>ppsA-1</i>	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	989	
<i>ppsA-2</i>	GGTTCTCTTCTCCGGCTCGTAG		
<i>trpE-1</i>	TTCAACTTCGGCGACTTCCA	441	
<i>trpE-2</i>	GGTGTCCATGTTGCCGTTCC		

Tabla 8: Descripción de los oligonucleótidos utilizados en el MLST. Descritos por Curran *et al.* (2004).

M7.2.5. Amplificación de ADN

Se utilizó el termociclador de *Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700*.

Condiciones de amplificación

1 ciclo inicial	1min. a 96 °C(desnaturalización)
38 ciclos consistentes en:	1min. a 96 °C (desnaturalización)
	1 min. a 55 °C (<i>annealing</i>)
	1 min a 72 °C (extensión)
Extensión final de un ciclo:	10 min a 72 °C.

M7.2.6. Electroforesis en gel de agarosa y visualización de resultados

Descrita en los apartados **M4.1.6. y M4.1.7.**

M7.2.7. Purificación del ADN desde el gel

Se purifico desde el gel el amplicon de *acsA*, debido a la presencia de una banda inespecífica. Mediante *PureLink®Quick Gel Extraction Kit* de *Invitrogen*, siguiendo las indicaciones del fabricante.

M7.2.8. Análisis de secuencias

El producto de amplificación o purificación fue secuenciado por *Macrogen* y se obtuvo una secuencia consenso para cada gen según lo descrito en el apartado **M4.3.7**. Las mismas fueron comparadas con las almacenadas en la base de datos de MLST, correspondiente a *P. aeruginosa* (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>). Se determinó el número de alelo y secuenciotipo.

M8. Detección de brotes de bacterias productoras de KPC

M8.1. Cepas bacterianas estudiadas

Los aislamientos que se tuvieron en consideración para este estudio epidemiológico, fueron los provenientes de brotes desde enero de 2009 hasta abril de 2012. El primer caso de *K. pneumoniae* productora de KPC proveniente de un paciente internado fue en junio del 2009 (caso índice), si bien, hubo un aislamiento previo, en enero del 2009 el mismo provino de un paciente ambulatorio y no se lo considero como caso propio.

Los datos de producción de KPC en *K. pneumoniae* se obtuvieron mediante el Sistema Informático de Resistencia (SIR), considerando que la resistencia a los carbapenemes se debía a la presencia de β -lactamasa tipo KPC. Esta ponderación se realizó, debido a que dichos aislamientos presentaban *screening* fenotípico positivo para KPC. A partir del SIR se analizaron los datos correspondientes a 482 aislamientos únicos de *K. pneumoniae*, obtenidos de pacientes internados en nuestro hospital.

En *P. aeruginosa* los datos de producción de KPC se obtuvieron a partir del análisis molecular, en el cual se determinó la presencia del gen bla_{KPC} por PCR. De los 114 aislamientos analizados por PCR, solo se incluyeron en este estudio los 91 aislamientos correspondientes al período en cuestión, 34 positivos y 57 negativos.

M8.2. Sumas acumuladas (CUSUM)

Con la finalidad de determinar si había un incremento en la producción de KPC con respecto al valor esperado (brote epidemiológico), tanto en *K. pneumoniae* como en *P. aeruginosa*, se llevó a cabo el método estadístico de Sumas acumuladas (CUSUM).

Este método estadístico está basado en el monitoreo continuo de las desviaciones de los datos observados con respecto al valor esperado en una ventana de tiempo. La suma acumulada de estas desviaciones, se denomina **valores de CUSUM**. Cuando el proceso evaluado se mantiene bajo control, los mismos varían aleatoriamente alrededor del valor cero. Por el contrario si los valores de CUSUM exceden un **valor de alerta o umbral (h)**, significa que el proceso se ha descontrolado (**Figura 15**), o en nuestro caso en particular que se ha producido un brote epidémico (Unkel *et al.* 2012).

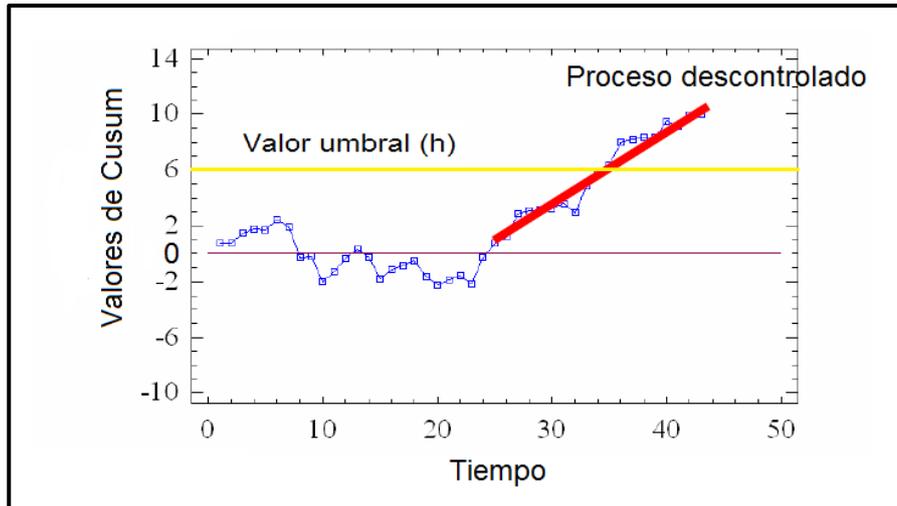


Figura 15: Carta esquemática de valores de CUSUM.

Variable k: Es la sensibilidad con la que detectamos el punto de descontrol. Por definición es la mitad de la variación que queremos detectar, expresada en unidades de desvío estándar.

$$k = (\delta/2)\sigma = (\mu_1 - \mu_0)/2$$

δ es el grado de desajuste que tratamos de detectar en unidades de desvío estándar (σ) y μ_0 Es la media esperada. En este trabajo, consideramos un valor esperado de producción de KPC de 16% para *K. pneumoniae* y de 18% para *P. aeruginosa*. Se evaluaron diferentes puntos o porcentajes de resistencia en los cuales detectar que el proceso se ha descontrolado, 20%, 25% y 30%.

Valor h: Es el error aceptable definido por nosotros. Usualmente es un equilibrio entre la probabilidad de error tipo I (falsa alarma) y tipo II (no detectar la desviación). Consideramos como error aceptable, un falso brote cada 24 meses.

Los valores de K y h son determinados en función de las características del proceso evaluado, es decir dentro de qué niveles queremos que fluctúe. Para lo cual debemos definir previamente que consideramos como situación fuera de control y error aceptable, ósea cuando queremos detectar dicha situación para implementar las medidas correctivas adecuadas.

Los valores de CUSUM (C_i) se obtienen a partir de la siguiente formula, considerando que el valor inicial (C_0) es cero.

$$C_i = \max (C_0, C_{i-1} + Xs - k) \quad \Rightarrow \quad C_i = \max (C_0, C_{i-1} + Xs - k)$$

El valor **Xs** es el resultado obtenido al estandarizar el proceso y se calcula en base a la siguiente ecuación.

$$Xs = X(N/T)/n$$

X: Promedio de aislamientos productores de KPC por mes.

N: Número total de aislamientos.

T: Número de meses evaluados.

n: Número de aislamientos por mes.

El objetivo de la utilización del CUSUM en esta tesis es detectar la presencia de brotes epidemiológicos, causados por bacterias productoras de KPC. Por tal motivo solo nos vamos a focalizar en la detección de incrementos en la frecuencia de producción de KPC, para ello se reemplazaron los valores negativos de CUSUM por cero.

M8.3. Diferencia en la tasa de producción de KPC

Con la finalidad de estandarizar los resultados y comparar la producción de KPC en *P. aeruginosa* con respecto a *K. pneumoniae*, se calculó la diferencia en la tasa de producción de KPC con respecto al período anterior para ambos microorganismos.

El período estudiado fue subdividido en los siguientes sub-períodos: **p₁** (01/2009 - 06/2009); **p₂** (07/2009 - 10/2009); **p₃** (11/2009 - 06/2010); **p₄** (07/2010 - 10/2010); **p₅** (11/2010 - 01/2011); **p₆** (02/2011 - 09/2011) y **p₇** (10/2011 - 04/2012).

La Diferencia de la tasa de producción de KPC con respecto al período anterior (**D**), se calculó a partir de la siguiente formula.

$$D = R_p / R_{pp}$$

La tasa de producción de KPC (R): Se obtiene dividiendo el N° de aislamientos KPC (+) por N° total de aislamientos.

p: Período evaluado y **pp:** Período previo al evaluado.

M9. Screening fenotípico de KPC en *P. aeruginosa*

Una vez determinada la presencia o ausencia del gen *bla*_{KPC}, se decidió evaluar tres métodos fenotípicos de *screening*, los cuales permitirían sospechar o detectar la presencia de este mecanismo de resistencia.

M9.1. Cepas bacterianas utilizadas

Se incluyeron dentro del estudio los 34 aislamientos de *P. aeruginosa* productores de KPC, obtenidos durante el segundo período analizado (post caso índice). Los cuales fueron comparados con los 43 aislamientos negativos del mismo período. Se evaluó un total de 77 cepas, las cuales fueron crecidas en AS a 37 °C.

M9.2. Métodos de Sinergia y Discos combinados con cloxacilina/ácido borónico

La presencia de KPC, se evidencio mediante la inhibición de dicha enzima por parte del ácido borónico. Sin embargo este inhibidor presenta como inconveniente, que no solo inhibe la KPC, sino también la cefalosporinasa cromosómica AmpC. Para discriminar entre estos dos mecanismos, se adiciono un segundo inhibidor específico de AmpC, como la cloxacilina (Pasteran *et al.* 2011a).

M9.2.1. Inóculo bacteriano

A partir de los subcultivos en AS, se realizaron suspensiones bacterianas equivalentes a un estándar 0,5 Mc Farland. Con un hisopo estéril embebido en el inóculo bacteriano se sembró la placa de AMH, de manera de obtener un crecimiento confluyente.

M9.2.2. Soluciones *stock* de las drogas inhibidoras

Para la preparación de las drogas *stock* se utilizó agua como diluyente en el caso de la preparación de cloxacilina (**C**) y N,N dimetilformamida para el ácido borónico (**B**). La pureza de cloxacilina (Instituto Malbrán) y ácido borónico (Britania), son del 92.9 y 98% respectivamente.

M9.2.3 Test de Sinergia

Para realizar el mismo se gotearon discos sin carga (Oxoid, Basingstoke, UK) con 10 μ L de cloxacilina (3.000 μ g/ disco) o ácido borónico (600 μ g/disco). Se evaluaron ambos carbapenemes (Oxoid), imipenem (10 μ g/disco) y meropenem (10 μ g/disco). Se depositaron los discos de los antimicrobianos e inhibidores sobre la superficie del agar, a una distancia entre antimicrobiano e inhibidor de 1 o 1,5 mm (borde a borde), según si las cepas eran KPC positivas o negativas respectivamente (**Figura 16**).

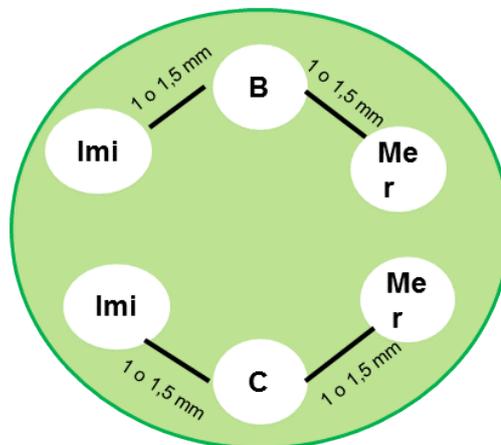


Figura 16: Localización de los discos de antimicrobianos e inhibidores en el test de sinergia. Imipenem (Imi), ácido borónico (B), meropenem (Mer), cloxacilina (C).

Se interpretó como sinergia positiva la observación de un aumento de la zona de inhibición (deformación del halo), entre el disco del carbapenem y el disco con inhibidor. Este fenómeno de agrandamiento es conocido comúnmente como “Efecto Huevo”.

M9.2.4. Test de Discos combinados

Al igual que el método anterior, este *test* se realizó para ambos carbapenemes y el inhibidor fue goteado en el momento de la prueba. Se utilizaron diferentes combinaciones del antibiótico: sin inhibidor; con 10 µl de ácido borónico (600 µg), con 10 µL cloxacilina (3.000 µg) y con ambos inhibidores (**Figura 17**).

Se consideró ácido borónico positivo, si la diferencia entre los halos del antimicrobiano solo y del antimicrobiano con inhibidor fue ≥ 4 mm. El punto de corte para cloxacilina fue ≥ 3 mm.

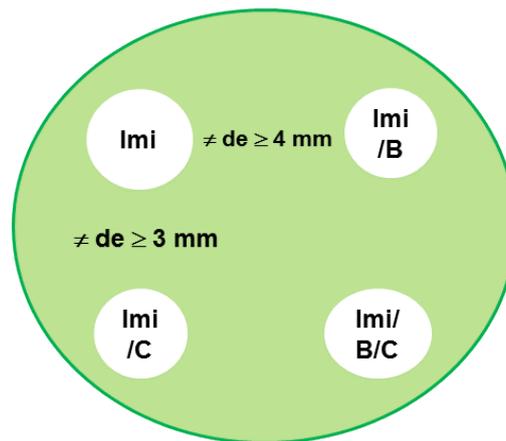


Figura 17: Localización de los discos de antimicrobianos e inhibidores en el test de discos combinados. Imipenem (Imi), ácido borónico (B), cloxacilina (C).

M9.3. Método de Hodge modificado

Esta metodología fue descrita por Pasteran *et al.* (2011b). Se realizó una suspensión bacteriana equivalente a un estándar 0,5 Mc Farland, de la cepa *K. pneumoniae* ATCC 700603. Con un hisopo estéril embebido en el inóculo bacteriano se sembró la placa de AMH, de manera de obtener un crecimiento confluyente. Se depositó en el centro de la placa el disco de imipenem o meropenem. Con ansa estéril se estrió la cepa en estudio, desde el borde de la placa hasta el disco (**Figura 18**).

Dentro del estudio se incluyeron dos cepas control, *E. coli* ATCC 25922 (control negativo) y el caso índice de *K. pneumoniae* (control positivo).

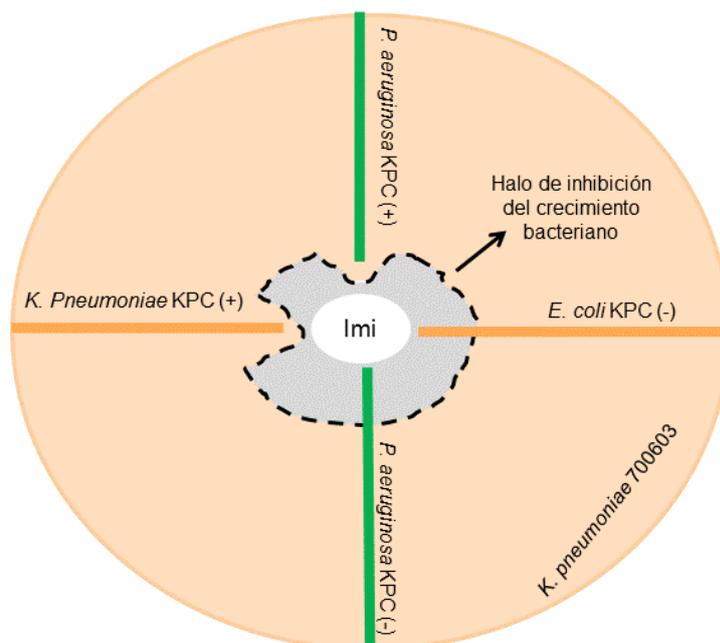


Figura 18: Representación esquemática del test de Hodge modificado.

En condiciones normales la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 es sensible a los carbapenemes, observándose el halo de inhibición del crecimiento bacteriano sin alteraciones. Sin embargo si la cepa en estudio es productora de la carbapenemasa tipo KPC, la misma hidroliza el carbapenem permitiendo el crecimiento de la cepa ATCC alrededor de la cepa en estudio. Este efecto se visualiza como una deformación del halo de inhibición en hendidura (**Figura 18**).

M10. Detección de las otras carbapenemasas IMP y VIM

Se descartó la presencia de metalo- β -lactamasas VIM e IMP a través de metodologías de caracterización fenotípica y molecular, las cuales se detallan a continuación:

M10.1. Inhibición con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para VIM e IMP

En el método de difusión por discos descrito en el apartado **M4.2.2**, se incluyó un disco de EDTA (372 µg/disco)/ Mercaptoacetato de sodio (900 µg/disco) entre los discos de los carbapenemes. Los discos se colocaron a una distancia de 1,5 mm de borde a borde.

Se consideró como prueba positiva, la presencia de “efecto huevo” entre los discos del carbapenem y EDTA.

M10.2. Detección de IMP y VIM por PCR

M10.2.1. Cepas bacterianas utilizadas

Se estudiaron tres cepas productoras de KPC, los dos primeros aislamientos detectados por PCR (318628 y 11716) y la cepa de *P. aeruginosa* productora de KPC resistente a col (12-1201).

Además se confirmó presencia de VIM o IMP por PCR, en las cuatro cepas que resultaron positivas en el *screening* con EDTA (7072, 12-236, 12-014 y 12-015).

M10.2.2. Extracción en crudo de ADN o *Boiling*

Descrito en el apartado **M4.1.2**.

M10.2.3. Mezcla de los componentes (Mix)

Se realizó tal como se detalla en el apartado **M4.1.3**, modificando únicamente los *primers* utilizados.

M10.2.4. Primers

Designación	Secuencia (5'→3')	Uso	Referencia
VIM-R	TGGG-CCATTCAGCCAGATC	Amplificación del gen <i>bla</i> _{VIM}	(Pagniez <i>et al.</i> 2006)
VIM-F	ATGGTGTTTGGTCGCATATC		
IMP-R	GTTTT-CCTTACCATATTTGGA	Amplificación del gen <i>bla</i> _{IMP}	
IMP-F	GAAGGCGTTTATGTTTCATACTT		

Tabla 9: Descripción de los oligonucleótidos utilizados en la detección de metalo-β-lactamasas.

M10.2.5. Amplificación de ADN

El protocolo de amplificación utilizado, se describe en el apartado **M4.1.5**.

M10.2.6. Control de calidad

Dentro del estudio se incluyeron como controles positivos, un aislamiento de *P. aeruginosa* VIM (+) y un *E. cloacae* IMP (+), pertenecientes a los controles de calidad del Instituto Malbrán.

M10.2.7. Electroforesis en gel de agarosa y Visualización de resultados

Descrita en los apartados **M4.1.6** y **M4.1.7**.

M11. Confirmación de la de resistencia a colistina

La cepa 12-1201 presento resistencia a colistina, la misma se confirmó por diferentes metodologías: Método automático (VITEK® 2 Compact, BioMérieux), *Etest*® (BioMérieux) y microdilución en caldo MH.

M11.1 VITEK® 2 Compact

Esta metodología se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante (Vitek 2 Instrument User Manual 510731-10EN1 (06/2008), <http://www.biomerieux.com>).

M11.2 Microdilución en caldo MH

M11.2.1. Preparación de la solución de Colistina

Se partió de una solución madre de 10.000 µg/mL, utilizando agua destilada como solvente. Se disolvió 25,6 µL en 1 mL de CMH (256 µg/mL). Se realizaron diluciones 1:2, en forma seriada hasta alcanzar una concentración final de 0,25 µg/mL. Se dispensaron en microplaca estéril de fondo plano 100 µL de cada dilución por pocillo.

M11.2.2. Preparación del Inóculo

Se realizaron suspensiones bacterianas equivalentes a un estándar 0,5 Mc Farland ($1 \cdot 10^8$ UFC/mL), de la cepa en estudio y de los controles. Las cuales se diluyeron 1:10 ($1 \cdot 10^7$ UFC/mL) y se colocó una alícuota de 5 µL por pocillo, siendo el inóculo final aproximadamente $5 \cdot 10^5$ UFC/mL.

M11.2.3 Lectura e interpretación de la CIM

Como se definió en el apartado **M4.2.3.4**, la CIM es la menor concentración de agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento bacteriano y se expresa en µg/mL. Para determinar la susceptibilidad o resistencia al antibiótico evaluado, se comparan los valores obtenidos de CIM con los puntos de corte recomendados por el CLSI (2013).

M11.3 Método de Etest

Con un hisopo estéril embebido en el inóculo bacteriano (0,5 Mc Farland) se sembró la placa de AMH, de manera de obtener un crecimiento confluyente. Se depositó la tira de *Etest* sobre la superficie del agar, las cuales poseen un gradiente exponencial continuo del antibiótico, cubriendo un rango de 0,016 a 256 µg/mL del antibiótico.

Las placas de AMH fueron incubadas entre 16 y 18 h a 37 °C, pasado este lapso de tiempo se observara una zona de inhibición del crecimiento bacteriano de forma elipsoidal. El valor de CIM se determina como el punto de intercepción entre dicha elipse y la tira de *Etest*.

M11.4 Control de calidad

Se incluyeron dos cepas control: *E. coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Estas cepas tienen un patrón conocido de resistencia o sensibilidad, así como también rangos de CIM establecidos (CLSI 2013). Si el valor de CIM correspondiente a la cepa control está dentro de este rango, entonces el control de calidad es aceptado.

RESULTADOS



RESULTADOS

R1. Epidemiología de *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en nuestra institución

El estudio de esta patógeno en nuestro nosocomio, desde enero del 2009 hasta abril del 2012, produjo 482 aislamientos únicos, clínicamente significativos de *K. pneumoniae*; 78 de los cuales fueron resistentes a los carbapenemes (**Tabla 10**), dando como resultado una resistencia anual del 16% (12 aislamientos por mes).

En enero de 2009, se detectó en nuestro centro, el primer aislamiento de *K. pneumoniae* productora de KPC, sin embargo al provenir de un paciente ambulatorio no fue considerado como caso propio. El primer caso de *K. pneumoniae* KPC (+), proveniente de un paciente internado se aisló el 26-06-2009, al cual se lo considero como el caso índice. A lo largo del período evaluado se observaron tres intervalos de tiempo, en los cuales se acrecentó el nivel de resistencia a un valor promedio del 42%; 1°) 09-2009 a 04-2010; 2°) 09-2010 a 11-2010 y 3°) 08-2011 a 04-2012 (**Figura 19**).

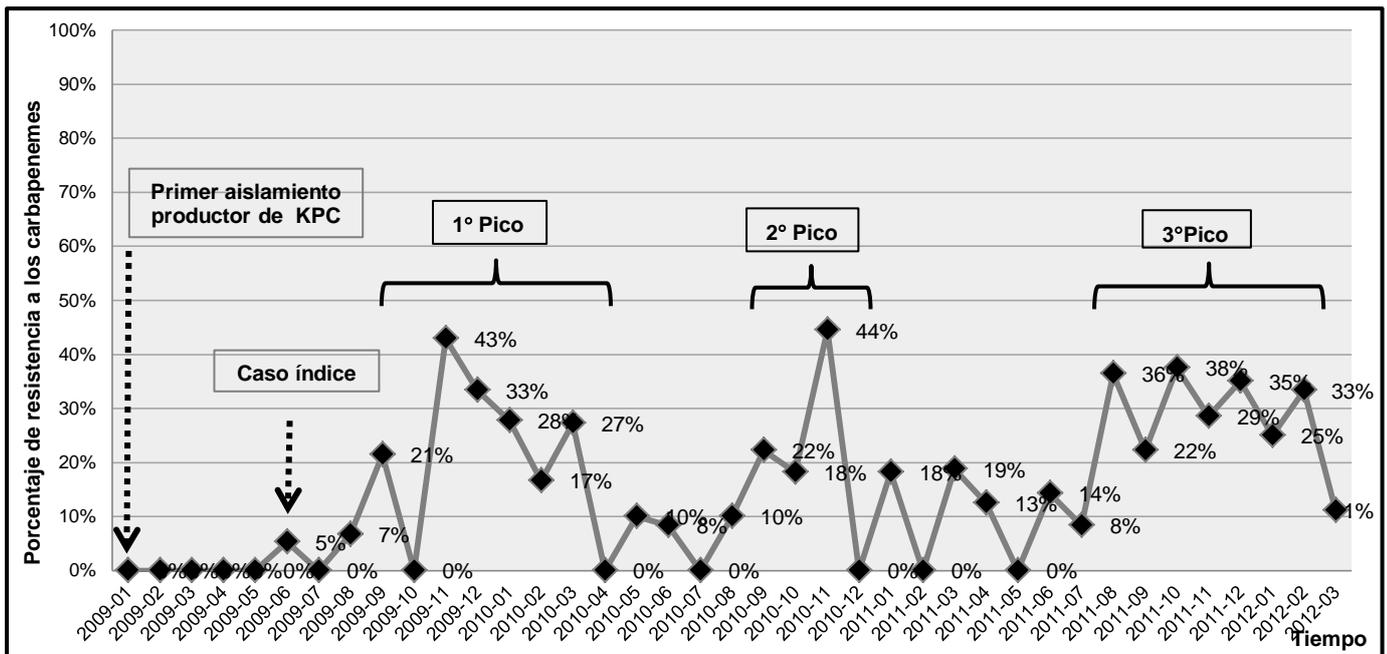


Figura 19: Distribución del porcentaje de resistencia a carbapenemes en *K. pneumoniae* (N=482), desde enero del 2009 a abril del 2012.

Fecha	N ° de aislamientos resistente (78)	N ° de aislamientos sensibles (404)	N° Total de aislamientos (482)	Tasa de resistencia	Tasa de resistencia x Promedio
2009-01	0	20	20	0,00	0,00
2009-02	0	17	17	0,00	0,00
2009-03	0	15	15	0,00	0,00
2009-04	0	13	13	0,00	0,00
2009-05	0	13	13	0,00	0,00
2009-06	1	18	19	0,05	0,63
2009-07	0	16	16	0,00	0,00
2009-08	1	14	15	0,07	0,80
2009-09	3	11	14	0,21	2,57
2009-10	0	9	9	0,00	0,00
2009-11	9	12	21	0,43	5,14
2009-12	4	8	12	0,33	4,00
2010-01	5	13	18	0,28	3,33
2010-02	1	5	6	0,17	2,00
2010-03	3	8	11	0,27	3,27
2010-04	0	15	15	0,00	0,00
2010-05	1	9	10	0,10	1,20
2010-06	1	11	12	0,08	1,00
2010-07	0	4	4	0,00	0,00
2010-08	1	9	10	0,10	1,20
2010-09	2	7	9	0,22	2,67
2010-10	2	9	11	0,18	2,18
2010-11	4	5	9	0,44	5,33
2010-12	0	9	9	0,00	0,00
2011-01	2	9	11	0,18	2,18
2011-02	0	4	4	0,00	0,00
2011-03	3	13	16	0,19	2,25
2011-04	1	7	8	0,13	1,50
2011-05	0	14	14	0,00	0,00
2011-06	1	6	7	0,14	1,71
2011-07	1	11	12	0,08	1,00
2011-08	4	7	11	0,36	4,36
2011-09	2	7	9	0,22	2,67
2011-10	6	10	16	0,38	4,50
2011-11	4	10	14	0,29	3,43
2011-12	7	13	20	0,35	4,20
2012-01	3	9	12	0,25	3,00
2012-02	3	6	9	0,33	4,00
2012-03	1	8	9	0,11	1,33
2012-04	2	0	2	1,00	12,00

Tabla 10: Descripción de la sensibilidad a carbapenemes por mes (2009-2012).

Fecha	Valores de CUSUM (20%)	Valores de CUSUM (25%)	Valores de CUSUM (30%)
2009-01	0	0	0
2009-02	0	0	0
2009-03	0	0	0
2009-04	0	0	0
2009-05	0	0	0
2009-06	0	0	0
2009-07	0	0	0
2009-08	0	0	0
2009-09	0	0	0
2009-10	0	0	0
2009-11	3	3	0
2009-12	5	4	2
2010-01	6	5	6
2010-02	6	5	9
2010-03	7	6	13
2010-04	5	3	15
2010-05	4	2	16
2010-06	3	1	17
2010-07	1	0	14
2010-08	0	0	11
2010-09	0	0	9
2010-10	0	0	6
2010-11	3	3	7
2010-12	1	1	6
2011-01	1	0	4
2011-02	0	0	2
2011-03	0	0	0
2011-04	0	0	0
2011-05	0	0	0
2011-06	0	0	0
2011-07	0	0	0
2011-08	2	2	0
2011-09	3	2	0
2011-10	5	4	2
2011-11	6	5	6
2011-12	8	7	11
2012-01	9	8	18
2012-02	11	9	26
2012-03	10	8	34
2012-04	20	18	52

Tabla 11: Valores de CUSUM para detectar distintos porcentajes de resistencia.

El método de CUSUM permite detectar la presencia de puntos de descontrol o brotes epidemiológicos, para lo cual se evaluaron tres porcentajes de resistencia o niveles de control: 20%, 25% y 30% (**Tabla 11**). De los mismos seleccionamos el de 25%, ya que mostro mejor sensibilidad para la detección de brotes. En estas condiciones los valores obtenidos de k y h (valor umbral), fueron 2,42 y 3 respectivamente.

Esta metodología permitió determinar la presencia de tres puntos de descontrol o brotes epidemiológicos, a lo largo del período evaluado. En concordancia con lo observado durante el análisis de los porcentajes de resistencia (**Figura 20**).

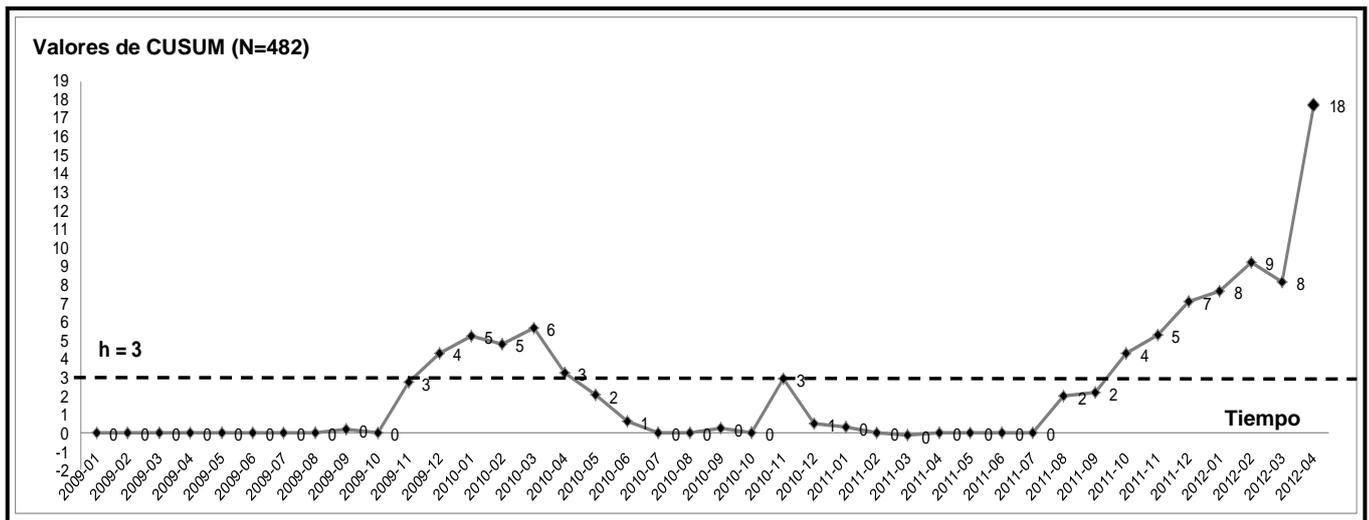


Figura 20: Gráfico de CUSUM para *K. pneumoniae*.

R2. Análisis de los niveles de resistencia y perfiles fenotípicos más frecuentes de *P. aeruginosa* en nuestra institución

Entre el 2000 y el 2008 se obtuvieron 1.216 aislamientos de *P. aeruginosa*, repartidos en dos períodos de tiempo, el primero de ellos comprendió desde el 2000 al 2004 (562 aislamientos) y el segundo abarcó desde el 2005 al 2008 (654 aislamientos). En la **Figura 21** se encuentra graficada la distribución de dichos aislamientos según su procedencia. Los materiales respiratorios fueron la principal fuente de *P. aeruginosa* (40-46%), seguido de los urocultivos (19-12%) y hemocultivos (9%).

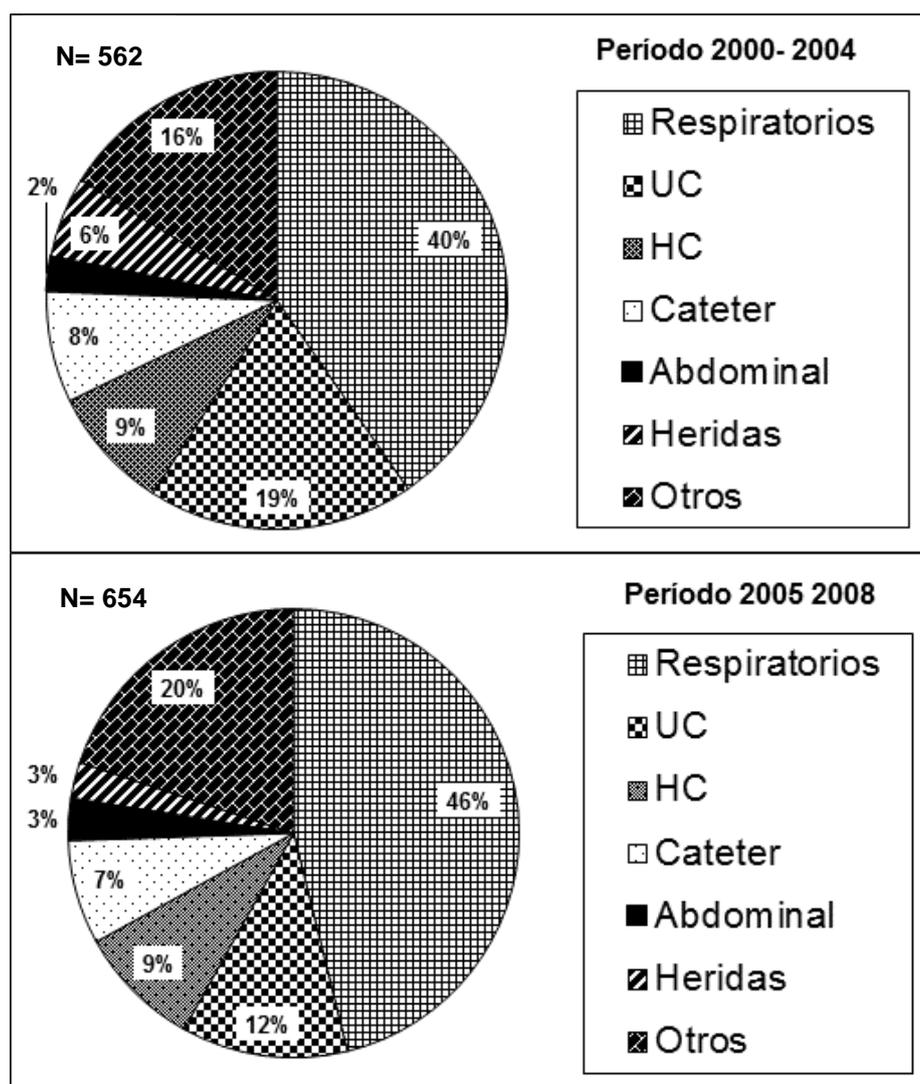


Figura 21: Distribución de los aislamientos según su material de origen, para ambos períodos. Hemocultivos (HC) y urocultivos (UC).

Los niveles de resistencia a los antibióticos antipseudomonales, se encuentran representados en la **Figura 22**. La ciprofloxacina fue el antibiótico que mostro el mayor

porcentaje de resistencia (51-54%). En contrapartida, la amikacina fue el antibiótico que más conservó su actividad antimicrobiana, mostrando el menor porcentaje de resistencia (16-18%). A diferencia de esta última, la gentamicina, que también pertenece a la familia de los aminogluósidos presentó un alto porcentaje de resistencia (38-40%).

Con respecto a los antibióticos β -lactámicos, los niveles de resistencia fueron de un 29-35% para el último período (**Figura 22**). A su vez dentro de este grupo de antibióticos, hubo un incremento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la resistencia a cefepime, imipenem y meropenem.

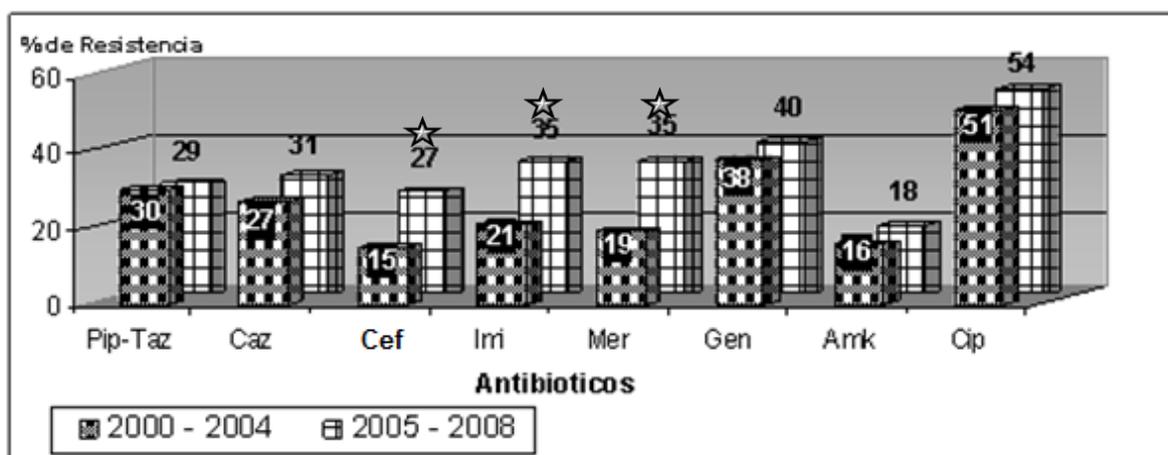


Figura 22: Porcentajes de resistencia a antibióticos antipseudomonaes, para los períodos de tiempo estudiados. Del 2000 al 2004 (N=562) y desde el 2005 al 2008 (N=654). Piperacilina/tazobactam (Pip-Taz), ceftazidima (Caz), cefepime (Cep), imipenem (Imi), meropenem (Mer), gentamicina (Gen), amikacina (Amk) y ciprofloxacina (Cip).

★ Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

Este estudio arrojó que el fenotipo de resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos sufrió un incremento significativo de 1,8 a 12,3%, convirtiéndose en el fenotipo más frecuente del segundo período (**Figura 23**). Conjuntamente con estos resultados, se evidenció un incremento, de 4,6 a 10,9%, en la resistencia simultánea a ambos carbapenemes, siendo el segundo perfil más frecuente. En concordancia a estos datos, la resistencia a uno o ambos carbapenemes prácticamente se duplicó pasando de 9,0 a 15,8%. Estos incrementos son un reflejo de lo ocurrido con la resistencia a imipenem y meropenem, cuyos niveles se elevaron de 21% y 19%, respectivamente a 35% en ambos casos. En contrapartida el nivel de resistencia única a imipenem no se modificó.

Por otra parte se observó que los antibióticos β -lactámicos, no carbapenemes, no presentaron un patrón de resistencia claramente preponderante ni cambios significativos

entre ambos períodos. Por lo que podemos inferir que el incremento en la resistencia a los carbapenemes o a todos los β -lactámicos, no sería a expensas de la disminución de estos perfiles, sino del fenotipo sensible a todos los β -lactámicos, el cual disminuyó de 72,9% a 53,6%.

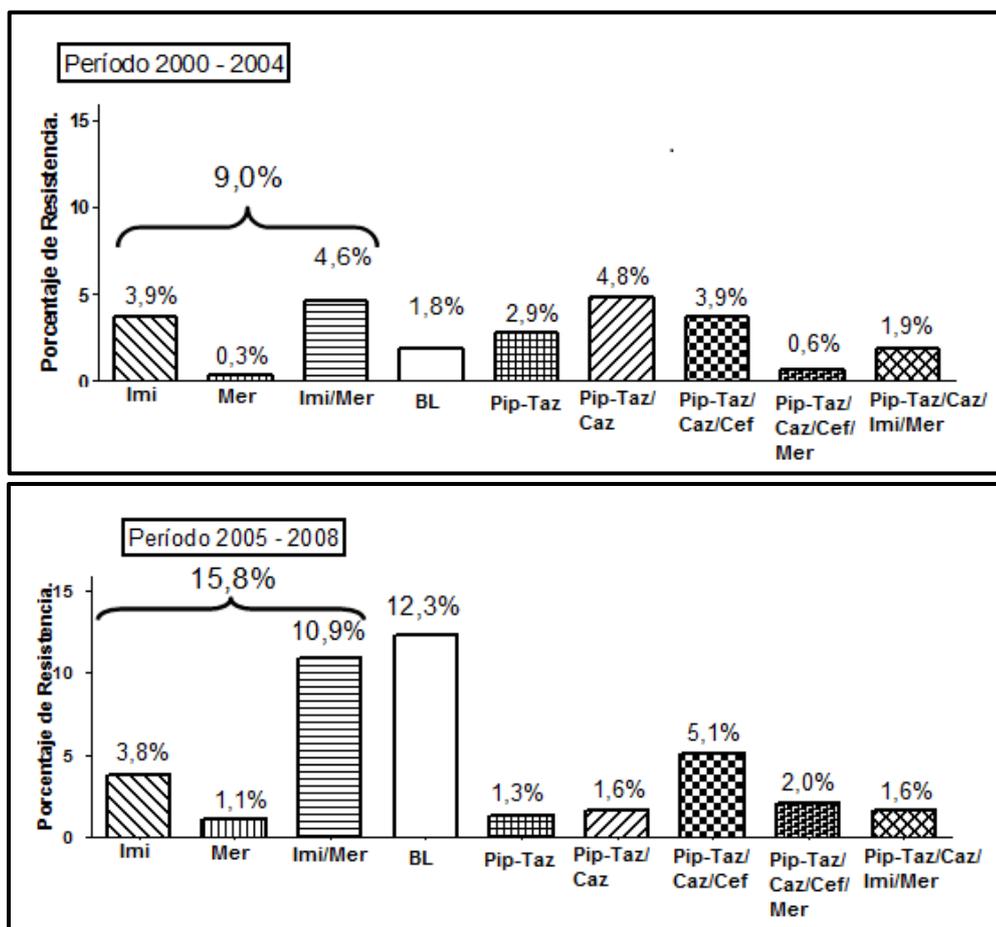


Figura 23: Distribución de los perfiles fenotípicos de los antibióticos β -lactámicos (BL) para ambos períodos. Del 2000 al 2004 (N=562) y desde el 2005 al 2008 (N=654). Imipenem (Imi), meropenem (Mer), β -lactámicos (BL), piperacilina/tazobactam (Pip-Taz), ceftazidima (Caz), cefepime (Cep).

En cuanto a los antibióticos no β -lactámicos, se observó mayor resistencia a los mismos ($p < 0.05$) en aislamientos con resistencia simultánea a todos los β -lactámicos (Figura 24).

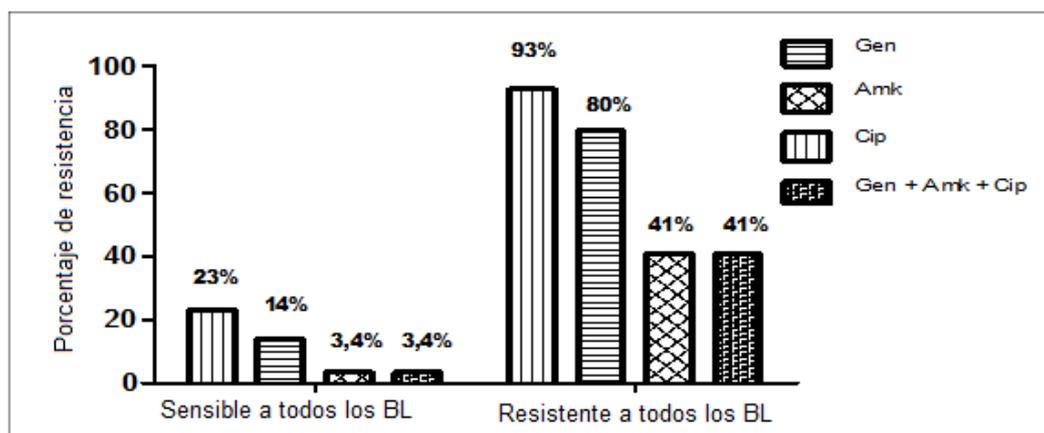


Figura 24: Resistencia a antibióticos no β-lactámicos (2005-2008), según fenotipos de resistencia (N=654). β-lactámicos (BL), gentamicina (Gen), amikacina (Amk) y ciprofloxacina (Cip).

Con el objetivo de determinar el consumo de carbapenemes en nuestro nosocomio, se utilizó la fórmula descrita en el apartado **M3.3**, y se obtuvo el consumo de imipenem y meropenem en Dosis Diaria Definida (DDD) por 1.000 pacientes/día para el período 2002-2007 (**Tabla12**). Se observó un incremento significativo en el consumo de imipenem y no así en el de meropenem que se mantuvo relativamente constante a lo largo del período evaluado (**Figura 25**).

Año	Consumo de imipenem (g)	DDD (2g)	Paciente/día	DDD/Paciente/día x 1.000
2002	838	419	27.174	15,42
2003	1.671	835,5	29.856	27,98
2004	1.850	925	33.001	28,03
2005	2.756	1.378	37.191	37,05
2006	4.289	2.144,5	31.629	67,80
2007	4.341	2.170,5	43.372	50,04

Tabla 12: DDD por 1.000 pacientes día por año (2002-2007).

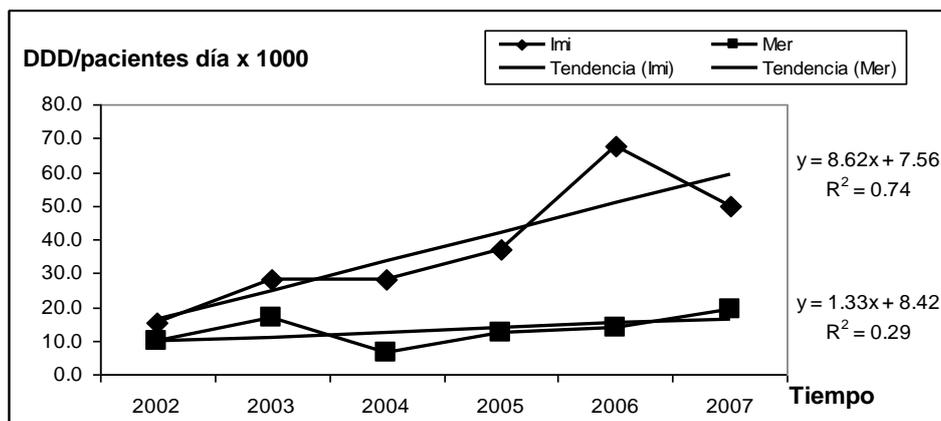


Figura 25: Curva de consumo de los carbapenemes durante el período 2002–2007.

R3. Detección del gen *bla_{KPC}* mediante PCR

En el período comprendido entre enero de 2005 y junio de 2009 (pre caso índice) se obtuvieron 37 cepas no productoras de KPC. Sin embargo de los 77 aislamientos obtenidos durante julio del 2009 y abril del 2012 (post caso índice), 34 dieron reacción positiva para KPC por PCR y 43 fueron negativos. Arrojando un porcentaje de positividad del 44%, dentro de los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenemes.

A pesar de que no se pudieron analizar todos los aislamientos obtenidos durante el período de interés (debido al carácter retrospectivo del estudio) es de destacar que las 3 cepas del mes de julio analizadas fueron negativas, mientras que de las seis cepas del mes de agosto, dos de ellas resultaron productoras de KPC.

Entre enero del 2009 y abril del 2014, se obtuvieron 457 aislamientos totales de *P. aeruginosa* en nuestra institución, de los cuales 195 mostraron resistencia a los carbapenemes (43%). Si consideramos un porcentaje de positividad para KPC dentro en este grupo del 44%, entonces 85 de los mismos serían KPC (+). Remitiéndonos a los 457 aislamientos totales de *P. aeruginosa*, aproximadamente el 18% sería productor de KPC. Por consiguiente el valor esperado de KPC en *P. aeruginosa* es 18% (Figura 26).

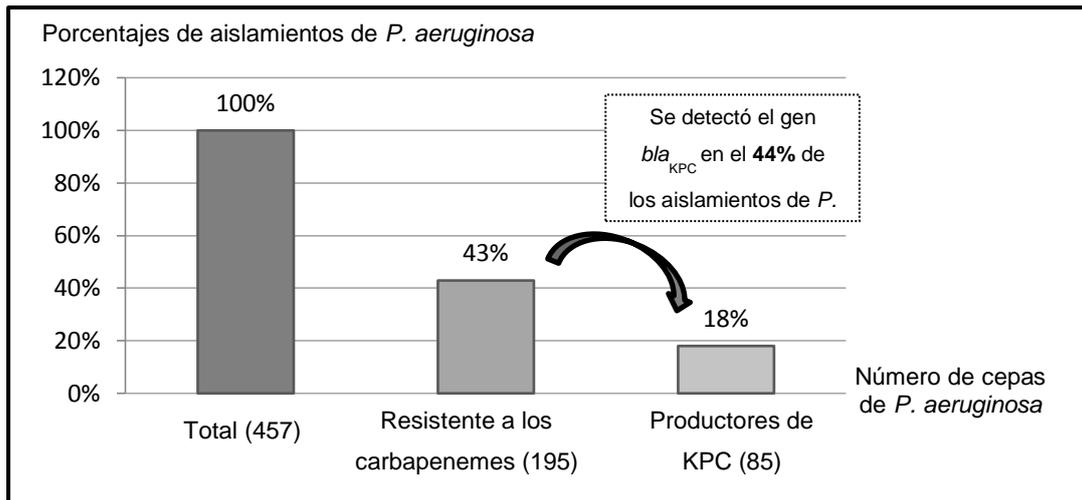


Figura 26: Distribución de KPC en *P. aeruginosa*.

R4. Resultados del estudio de sensibilidad

Los aislamientos productores de KPC fueron sensibles a Amk, Gen y Col, excepto una cepa que adquirió resistencia a colistina. Mientras que las cepas KPC (-) denotaron diferentes perfiles de sensibilidad a los antibióticos antipseudomonaes, a excepción de un aislamiento con fenotipo mucoso, el cual mostro el mismo perfil observado en las KPC (+) (**Tabla 13**).

Es de destacar, que todas las cepas KPC (+) tuvieron un halo de inhibición de 6 mm, tanto para imipenem como meropenem. Por el contrario, los aislamientos no productores de carbapenemasas mostraron mayor variabilidad en los halos de inhibición a carbapenemes. En el caso de imipenem tuvieron un rango de 9 a 14 mm y en meropenem fueron de 6 a 18 mm (**Tabla 13** y **Figura 27**).

Solo 4 aislamientos fueron productores de metalo- β -lactamasas, detectados inicialmente por la inhibición con EDTA y confirmados mediante la amplificación del gen bla_{VIM} por PCR. Tres de los mismos mostraron halos de inhibición a los carbapenemes y ceftazidima, similar a lo observado en las cepas KPC (+). En contrapartida, el cuarto aislamiento tuvo halos de inhibición a Pip-Taz, Caz y Cef dentro del rango de sensibilidad, siendo este último un perfil más cercano a los obtenidos en las cepas KPC (-). Con respecto a aztreonam, dos aislamientos fueron sensibles y dos intermedios, a diferencia de las cepas KPC (+) que mostraron resistencia al mismo (**Tabla 14**).

La ciprofloxacina fue el antibiótico con menor actividad *in vitro*, tanto en cepas KPC (+) como KPC (-), con un halo promedio de 6 mm en ambos casos. Seguido de gentamicina cuyas medianas fueron de 13 mm para las KPC (+) y de 21 mm para las KPC (-). Mientras que amikacina, fue el antibiótico de mayor actividad, con una mediana de 23 mm tanto en aislamientos KPC (+) como KPC (-) (**Tabla 13**).

Con respecto a Pip-Taz, Caz y Cef conservan buena actividad en los aislamientos KPC (-), con una mediana de 21 mm. Sin embargo las cepas KPC (+) muestran mayor resistencia, con medianas de 11 y 6 mm (**Tabla 13** y **Figura 28**).

		Pip-Taz	Caz	Cep	Imi	Mer	Amk	Gen	Cip	Col	Azt
KPC (-) y VIM (-). N =39	Máximo	29	30	28	14	18	33	27	35	23	29
	Mínimo	6	6	6	9	6	6	6	6	8	6
	Promedio	20	21	19	11	11	21	14	11	15	20
	Mediana	21	21	21	11	10	23	13	6	15	21
	Desvío estándar	7	7	6	1	3	6	8	9	2	7
KPC (-) y VIM (+). N=4	Máximo	22	22	20	14	18	30	26	30	16	2
	Mínimo	13	9	10	6	6	6	6	6	15	13
	Promedio	16	13	14	9	9	16	13	12	15	16
	Mediana	14	10	14	7	6	14	11	6	15	14
	Desvío estándar	4	6	4	4	6	12	10	12	1	4
KPC (+). N = 34	Máximo	14	14	6	6	6	30	30	7	18	14
	Mínimo	6	6	6	6	6	20	17	6	10	6
	Promedio	11	11	6	6	6	24	21	6	15	11
	Mediana	11	11	6	6	6	23	20	6	16	11
	Desvío estándar	2	2	0	0	0	2	3	0	1	2

Tabla 13: Distribución de los halos de inhibición bacteriana (mm) en el antibiograma por difusión. Piperacilina/tazobactam (Pip-Taz), ceftazidima (Caz), cefepime (Cep), imipenem (Imi), meropenem (Mer), amikacina (Amk), gentamicina (Gen), ciprofloxacina (Cip), colistina (Col) y aztreonam (Azt).

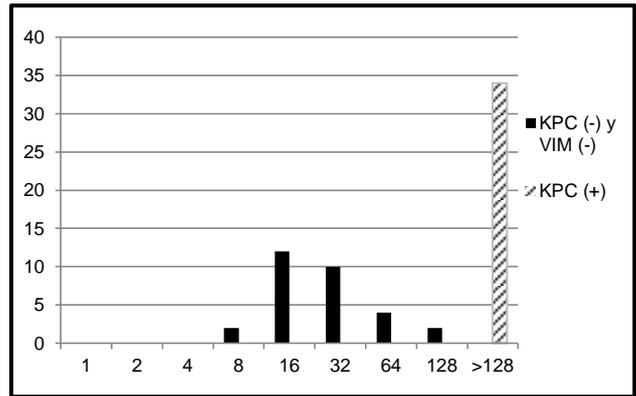
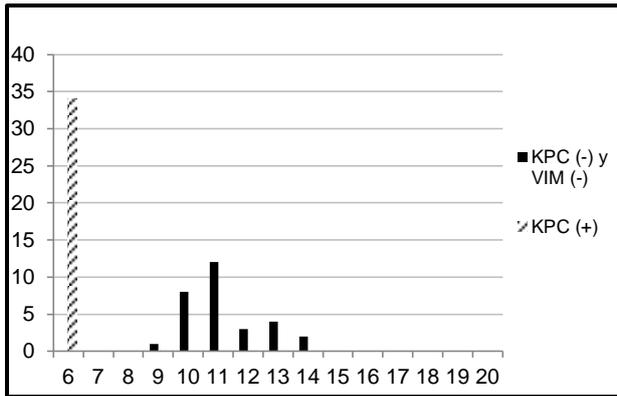


Figura 27: Distribución de los halos de inhibición (derecha) y valores de CIM (izquierda) a imipenem. 34 KPC (+) y 39 KPC (-).

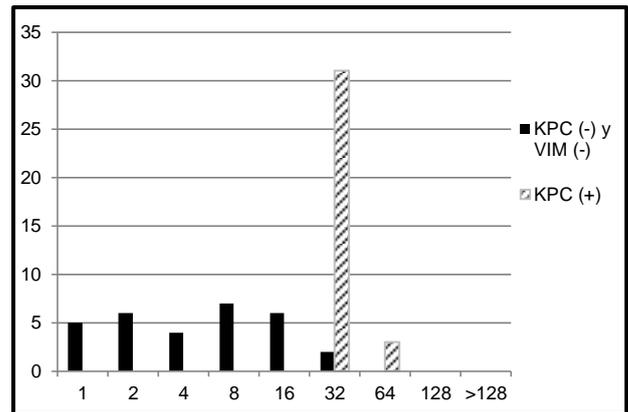
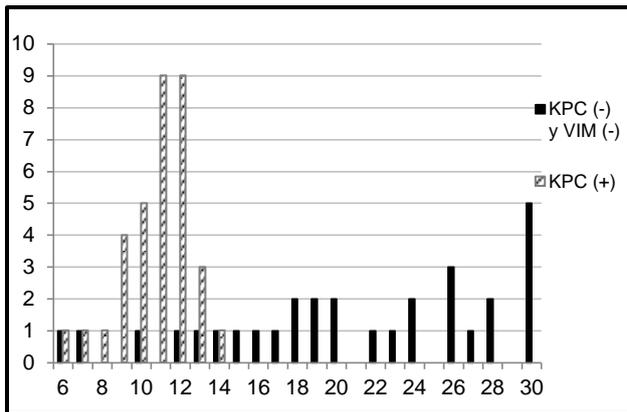


Figura 28: Distribución de los halos de inhibición (derecha) y valores de CIM (izquierda) a ceftazidima. 34 KPC (+) y 39 KPC (-).

Nº de Cepa	Pip-Taz	Caz	Cep	Imi	Mer	Amk	Gen	Cip	Col	Azt
7072	22	22	20	14	18	30	26	30	16	28
12-236	15	11	15	6	6	21	15	6	15	24
12-014	13	9	12	7	6	6	6	6	15	16
12-015	13	9	10	7	6	6	6	6	15	17

Tabla 14: Halos de inhibición (mm) a los distintos antipseudomonales de los aislamientos productores de metalo-β-lactamasas. Piperacilina/tazobactam (Pip-Taz), ceftazidima (Caz), cefepime (Cep), imipenem (Imi), meropenem (Mer), amikacina (Amk), gentamicina (Gen), ciprofloxacina (Cip), colistina (Col) y aztreonam (Azt).

Los valores de CIM fueron concordantes a los resultados obtenidos por el método de difusión. Los aislamientos KPC (-) se caracterizaron por tener valores de CIM a Caz y Cef que van desde la sensibilidad (CIM = 1) hasta la resistencia (CIM = 32), siendo la CIM₅₀ = 4 µg/mL para ambos antibióticos. Solo 2 cepas fueron resistentes a Caz, con valores de CIM que no superaron los 32 µg/mL. Todas las cepas fueron resistentes a imipenem con valores de CIM entre 8 y 128 µg/mL, observándose una CIM₅₀ de 32 µg/mL (Tabla 15 y Figura 28).

En contraposición los aislamientos KPC (+) fueron resistentes a Caz y Cef, exhibiendo mayores valores de CIM, la CIM₅₀ fue de 32 µg/mL para Caz y 128 µg/mL para Cef. La mayoría de las cepas mostraron valores de CIM a Caz de 32 µg/mL, excepto 3 que tuvieron una CIM de 64 µg/mL. A su vez todos los aislamientos mostraron alta resistencia a imipenem y meropenem con valores de CIM mayores a 128 µg/mL (Tabla 15 y Figura 28).

		Imi	Mer	Caz	Cef
KPC (-) y VIM (-). N= 39	CIM mínima	8	4	1	2
	CIM máxima	128	32	32	32
	CIM₅₀	32	8	4	4
	CIM₉₀	64	16	16	16
KPC (+). N=34	CIM mínima	> 128	> 128	32	128
	CIM máxima	> 128	> 128	64	> 128
	CIM₅₀	> 128	> 128	32	128
	CIM₉₀	> 128	> 128	32	> 128

Tabla 15: Distribución de los valores de CIM (µg/mL) para imipenem (Imi), meropenem (Mer), ceftazidima (Caz) y cefepime (Cef).

R5. Entorno genético del gen *bla*KPC por PCR

Mediante la técnica de mapeo por PCR se analizaron 3.519 pb de la secuencia correspondiente al transposón Tn4401, la cual fue comparada con diferentes secuencias almacenadas en la base de datos *GenBank*. Dicha comparación arrojó que la variante de KPC presente en nuestros aislamientos, era KPC-2, flanqueada por las secuencias de inserción ISkpn6 e ISkpn7.

Este análisis, también mostro que nuestra secuencia era idéntica a la variante **Tn4401b** (secuencias pBC633, pBC2303 y pCOL1), la cual se diferencia del resto de las isoformas por ausencia de deleciones entre *bla*KPC e istB; (**Figura 29**).

Por otra parte, nuestros aislamientos no poseen una *bla*TEM truncada en dirección *upstream* del gen *bla*KPC-2. Además la secuencia de *tnpA* está completa, a diferencia de la ISkpn6-like (pPA-2), reportada en Colombia (**Figura 30**).

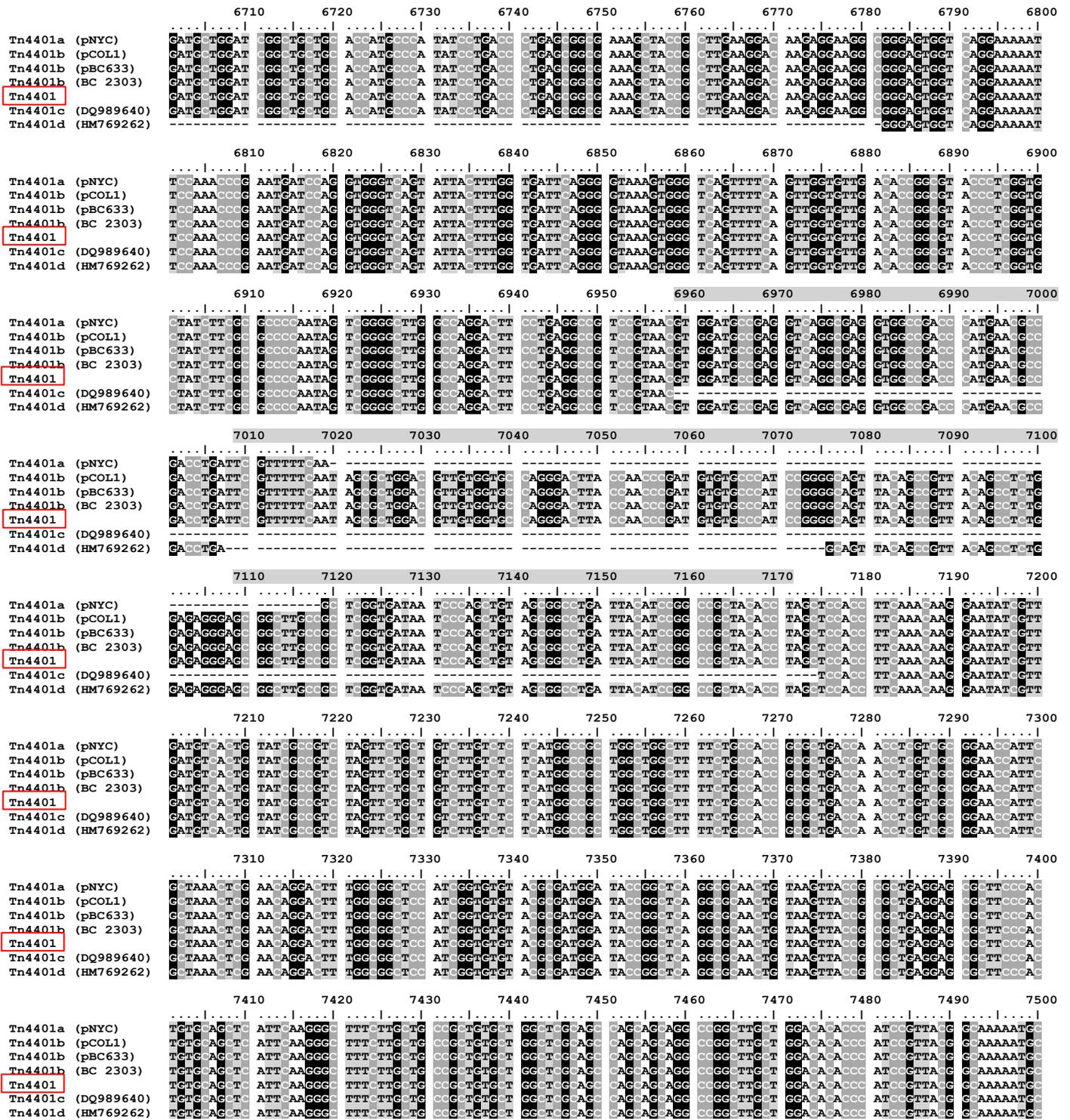


Figura 29: Alineamiento de las Isoformas del Tn4401: Tn4401a, -99 pb (7.019-7.118); Tn4401c, -215 pb (6.959-7.174) y Tn4401d, 68 pb (7.007-7.075). La secuencia del aislamiento obtenido en nuestro hospital esta resaltada en color rojo. Los números del *GeneBank* correspondientes a las cepas utilizadas en el alineamiento son: EU176011.1 (pNYC), EU176013.1 (pCOL1), EU176012.1 (pBC633), EU176014.1 (pBC2303), DQ989640 y HM769262. Este alineamiento se realizó con el programa *Vector NTI advance* 11.5.1.

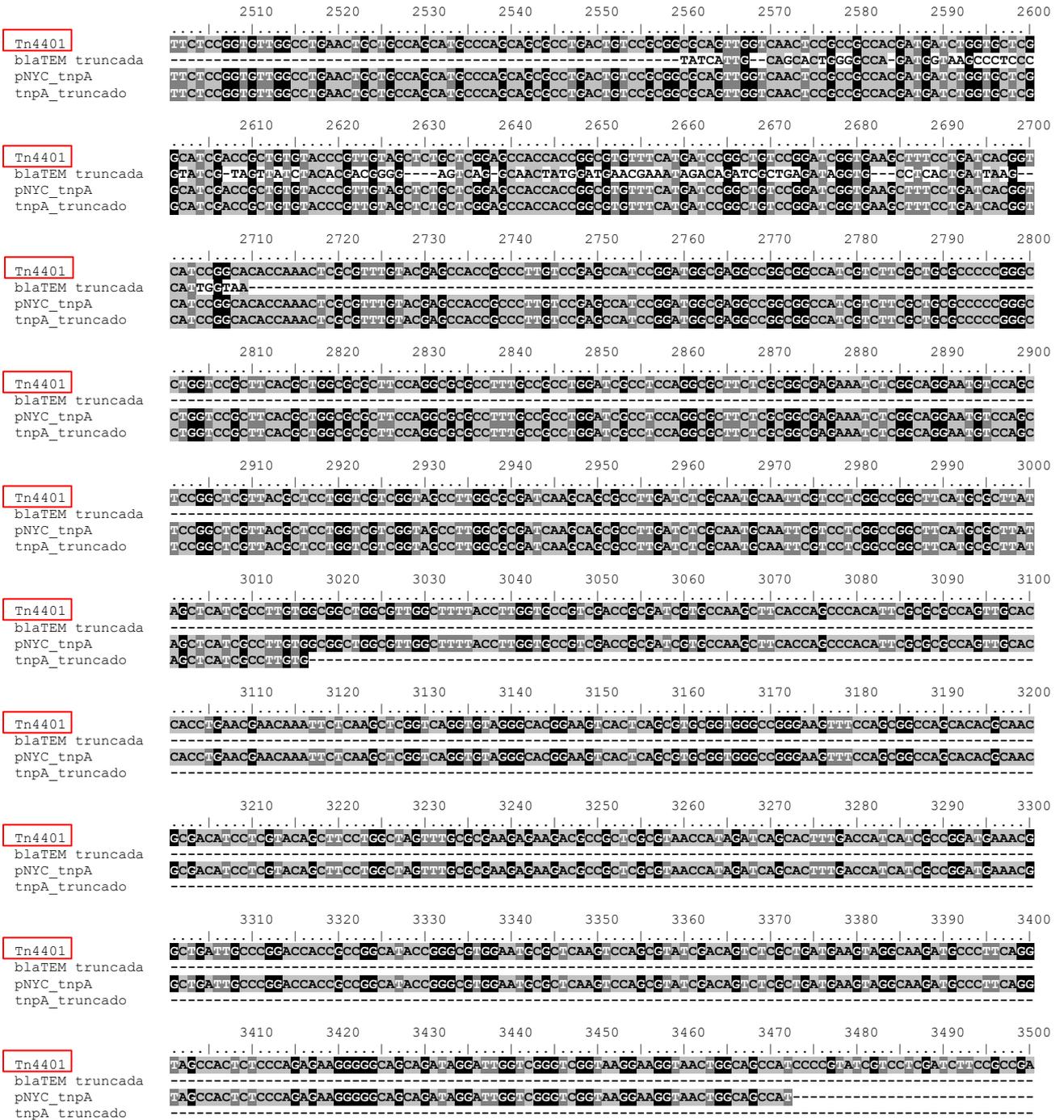


Figura 30: Alineamiento del Tn4401 con estructuras reportadas en diferentes NTE_{KPC}. La secuencia del aislamiento obtenido en nuestro hospital esta resaltada en color rojo. Los números del GeneBank correspondientes a las cepas utilizadas en el alineamiento son: EU176011.1 (*tnpA_pNYC*), JN545009 (*bla_{TEM}* truncada y *tnpA_truncado* o *ISKpn6-like*, ambas estructuras de pPA-2). Este alineamiento se realizó con el programa *Vector NTI advance* 11.5.1.

R6. Análisis epidemiológico en *Pseudomonas aeruginosa*

R6.1. Estudio de la relación clonal de *P. aeruginosa* productora KPC

El análisis de los perfiles de bandas obtenidos por REP-PCR, mostró que todos los aislamientos KPC positivos, incluida la cepa resistente a colistina, tenían el mismo patrón de bandas por REP-PCR (**Figura 31**).

Estos resultados coinciden con el análisis genotípico por MLST, en el cual todos los aislamientos KPC (+) presentaron idéntico perfil alélico: *acsA* 17, *aroE* 5, *guaA* 26, *mutL* 3, *nuoD* 4, *ppsA* 4 y *trpE* 26, perteneciente al secuenciotipo 654 (ST654).

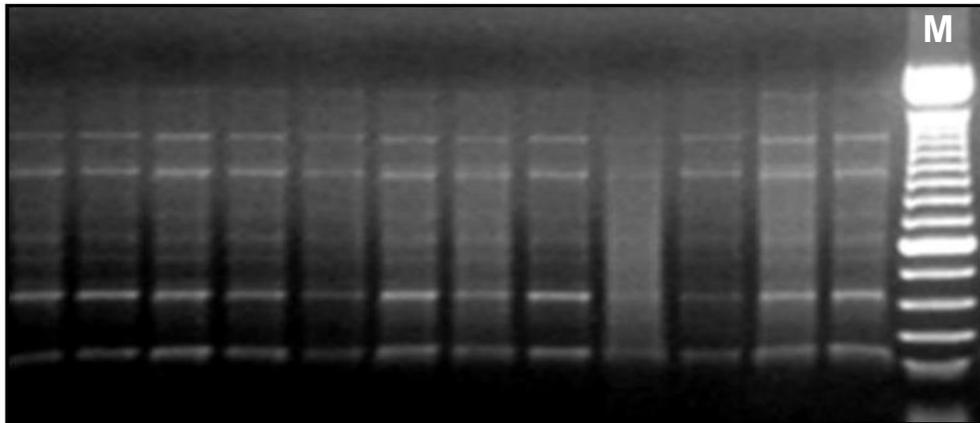


Figura 31: Gel de REP-PCR correspondiente a 12 aislamientos productores de KPC.

M: Marcador de peso molecular de 0,1 a 1,5 kb (Invitrogen).

R6.2. CUSUM en la detección de brotes por *P. aeruginosa* productora de KPC

Entre enero del 2009 y abril del 2014, se obtuvieron 195 aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenemes, de los cuales se determinó la presencia o ausencia del gen *bla*_{KPC} por PCR, en 91 aislamientos (**Tabla 16**).

Fecha	N ° de aislamientos KPC positivos. N = 34	N ° de aislamientos KPC negativos. N = 57	N° Total de aislamientos. N = 91	Tasa de positividad	Tasa de positividad X Promedio
2009-01	0	1	1	0,0	0
2009-02	0	2	2	0,0	0
2009-03	0	2	2	0,0	0
2009-04	0	3	3	0,0	0
2009-05	0	5	5	0,0	0
2009-06	0	1	1	0,0	0
2009-07	0	3	3	0,0	0
2009-08	2	4	6	0,3	2
2009-09	2	3	5	0,4	3
2009-10	2	3	5	0,4	3
2009-11	1	3	4	0,3	2
2009-12	0	2	2	0,0	0
2010-01	0	0	0	0	0
2010-02	0	0	0	0	0
2010-03	0	0	0	0	0
2010-04	0	0	0	0	0
2010-05	0	0	0	0	0
2010-06	0	0	0	0	0
2010-07	1	0	1	1,0	7
2010-08	0	0	0	0	0
2010-09	0	0	0	0	0
2010-10	0	2	2	0,0	0
2010-11	2	1	3	0,7	5
2010-12	0	0	0	0	0
2011-01	3	5	8	0,4	3
2011-02	0	0	0	0	0
2011-03	1	1	2	0,5	4
2011-04	0	1	1	0,0	0
2011-05	0	0	0	0	0
2011-06	1	1	2	0,5	4
2011-07	4	1	5	0,8	6
2011-08	1	2	3	0,3	2
2011-09	2	2	4	0,5	4
2011-10	2	1	3	0,7	5
2011-11	0	3	3	0,0	0
2011-12	5	2	7	0,7	5
2012-01	5	2	7	0,7	5
2012-02	0	0	0	0	0
2012-03	0	0	0	0	0
2012-04	1	0	1	1,0	7

Tabla 16: Resultados de la PCR para *bla*_{KPC} en *P. aeruginosa*, por mes en el período comprendido entre enero del 2009 y abril del 2014.

Se analizaron tres puntos o porcentajes de resistencia en los cuales detectar que el proceso se ha descontrolado, 20%, 25% y 30% (**Tabla 17**). Se obtuvieron los mismos resultados en las distintas situaciones, en todos los casos el proceso se descontroló a partir de 2009-12. Por lo que seleccionamos el punto de 25%, al igual que en *K. pneumoniae*. En estas condiciones los valores obtenidos de k y h (valor umbral), fueron 2,5 y 3 respectivamente.

Fecha	Valores de CUSUM (20%)	Valores de CUSUM (25%)	Valores de CUSUM (30%)
2009-01	0	0	0
2009-02	0	0	0
2009-03	0	0	0
2009-04	0	0	0
2009-05	0	0	0
2009-06	0	0	0
2009-07	0	0	0
2009-08	2	0	0
2009-09	3	1	1
2009-10	3	2	1
2009-11	2	0	0
2009-12	8	6	5
2010-01	14	11	11
2010-02	19	17	16
2010-03	25	22	21
2010-04	31	28	27
2010-05	36	33	32
2010-06	42	39	38
2010-07	48	44	43
2010-08	53	50	48
2010-09	52	48	47
2010-10	56	51	50
2010-11	61	57	55
2010-12	63	58	56
2011-01	68	63	62
2011-02	70	65	64
2011-03	69	64	62
2011-04	75	69	67
2011-05	77	71	69
2011-06	81	75	73
2011-07	82	76	74
2011-08	85	78	76
2011-09	88	81	79
2011-10	87	80	77
2011-11	90	83	81
2011-12	94	87	84
2012-01	100	92	90
2012-02	105	98	95
2012-03	111	103	100
2012-04	110	102	99

Tabla 17: Valores de CUSUM para diferentes puntos o porcentajes de resistencia (20%, 25% y 30%) en los cuales detectar que el proceso se ha descontrolado.

A diferencia del patrón observado en *K. pneumoniae*, cuyo gráfico de CUSUM mostro varios puntos de descontrol o brote epidemiológico, en el transcurso del período evaluado, *P. aeruginosa* presentó un único punto de inflexión a partir del cual los valores de Ci excedieron el valor umbral ($h=3$). Cuando el proceso se descontroló, los valores de Ci variaron en forma azarosa alrededor de una pendiente positiva, sin alcanzar el cero o valores negativos. Este patrón de CUSUM implica que el proceso nunca logro ser controlado. Otro dato de relevancia, es que el proceso se descontroló a partir del 12-2009, durante el transcurso del primer brote de *K. pneumoniae* productora de KPC (**Figura 32**).

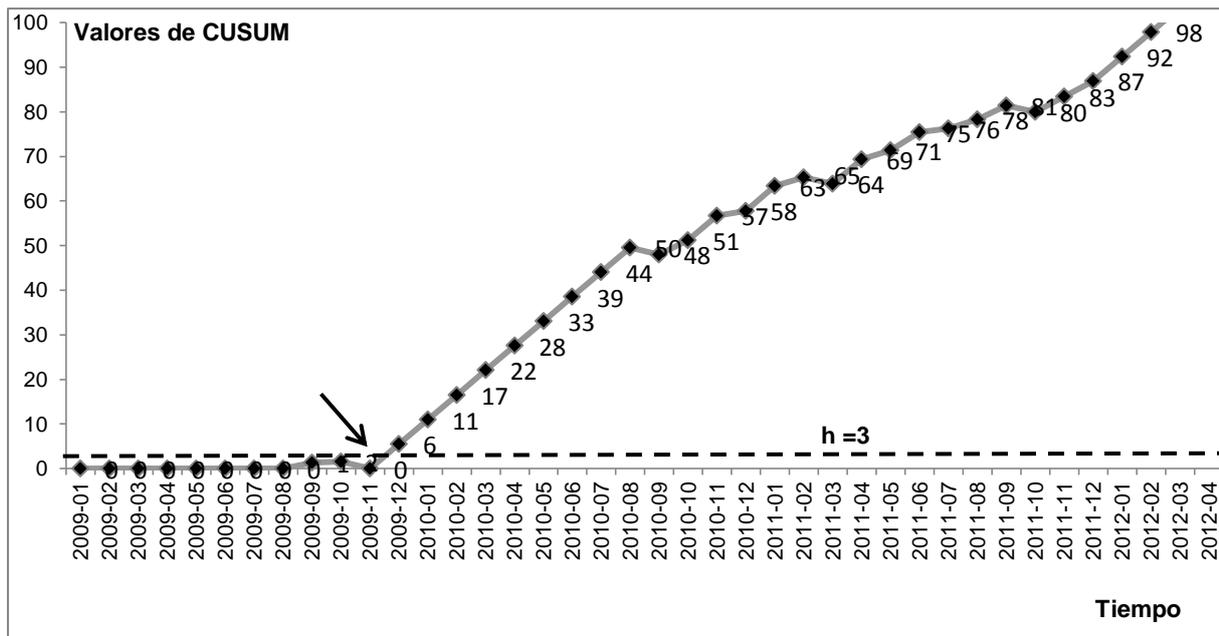


Figura 32: Gráfico de CUSUM para *P. aeruginosa*. La flecha marca el punto donde el proceso se descontroló (brote).

R6.3. Diferencia en la tasa de producción de KPC

Otra herramienta estadística utilizada para comparar la distribución epidemiológica de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* KPC positivas, fue el cálculo de la diferencia en la tasa de producción de KPC (Tablas 18 y 19).

Período evaluado	N° de aislamientos KPC (+)	N° de aislamientos KPC (-)	N° total de aislamientos	Tasa de producción de KPC	Diferencia de la tasa de producción de KPC con respecto al período anterior
01/2009 - 06/2009	0	96	96	0,00	
07/2009 - 10/2009	5	50	55	0,09	0,00
11/2009 - 06/2010	24	81	105	0,23	2,51
07/2010 - 10/2010	5	29	34	0,15	0,64
11/2010 - 01/2011	6	23	29	0,21	1,41
02/2011 - 09/2011	12	69	81	0,15	0,72
10/2011 - 04/2012	26	56	82	0,32	2,14
Total	78	404	482	0,16	

Tabla 18: Cálculo de la diferencia en la tasa de producción de KPC con respecto al período anterior para *K. pneumoniae*.

Período evaluado	N° de aislamientos KPC (+)	N° de aislamientos KPC (-)	N° total de aislamientos	Tasa de producción de KPC	Diferencia de la tasa de producción de KPC con respecto al período anterior
01/2009 - 06/2009	0	14	14	0,00	
07/2009 - 10/2009	5	14	19	0,26	0,00
11/2009 - 06/2010	1	5	6	0,17	0,63
07/2010 - 10/2010	1	2	3	0,33	2,00
11/2010 - 01/2011	5	6	11	0,45	1,36
02/2011 - 09/2011	9	8	17	0,53	1,16
10/2011 - 04/2012	13	8	21	0,62	1,17
Total	34	57	91	0,37	

Tabla 19: Cálculo de la diferencia en la tasa de producción de KPC con respecto al período anterior para *P. aeruginosa*.

Los resultados originados a través del cálculo de la diferencia en la tasa de producción de KPC, tanto en *P. aeruginosa* como *K. pneumoniae*, fueron concordantes con los obtenidos por el método de CUSUM. La tasa de producción de KPC en *K. pneumoniae* presenta tres picos claramente definidos a lo largo del período evaluado, mientras que en *P. aeruginosa* la tasa de producción de KPC muestra un solo incremento, el cual comienza a medida que disminuye la producción de KPC en *K. pneumoniae* durante el primer brote. Es de destacar que aunque el porcentaje de producción de KPC en *P. aeruginosa* disminuyó, no llegó a cero sino que se mantuvo a un nivel basal.

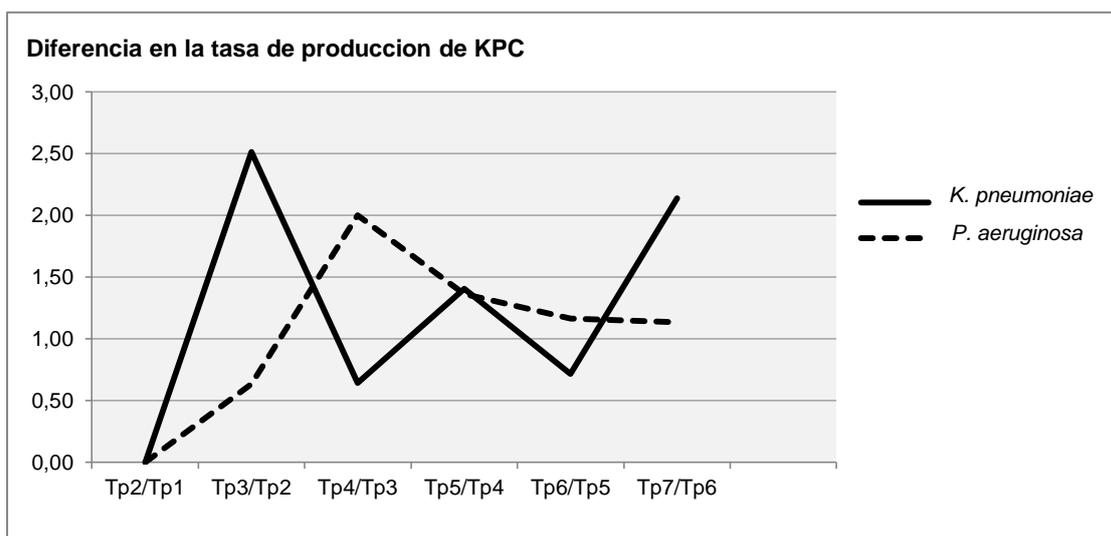


Figura 33: Diferencia en la tasa (T) de producción de KPC. Períodos de tiempo: **p1** (01/2009 a 06/2009), **p2** (07/2009 a 10/2009), **p3** (11/2009 a 06/2010), **p4** (07/2010 a 10/2010), **p5** (11/2010 a 01/2011), **p6** (02/2011 a 09/2011) y **p7** (10/2011 a 04/2012).

R7. Screening fenotípico de KPC en *P. aeruginosa*

R7.1. Test de sinergia

El perfil esperable en las cepas de *P. aeruginosa* productoras de KPC, es la inhibición positiva con ácido borónico y negativa con cloxacilina, mientras que los aislamientos KPC negativos muestran sinergia positiva, con ambos inhibidores (**Figura 34**).

Se consideraron como positivos verdaderos, a aquellas cepas productoras de KPC que mostraron el perfil de inhibición única con ácido borónico. Si este patrón se obtenía en cepas KPC negativas, las mismas se las clasificaba como falsos positivos. Las cepas que mostraron inhibición tanto con ácido borónico como con cloxacilina, se clasificaron como negativos verdaderos o falsos negativos, según si eran KPC negativas o positivas

respectivamente. Al resto de las posibles combinaciones obtenidas se las agrupo como resultados indeterminados, ya que precisarían de la realización de un segundo *test* para confirmar o descartar la presencia de betalactamasa tipo KPC.

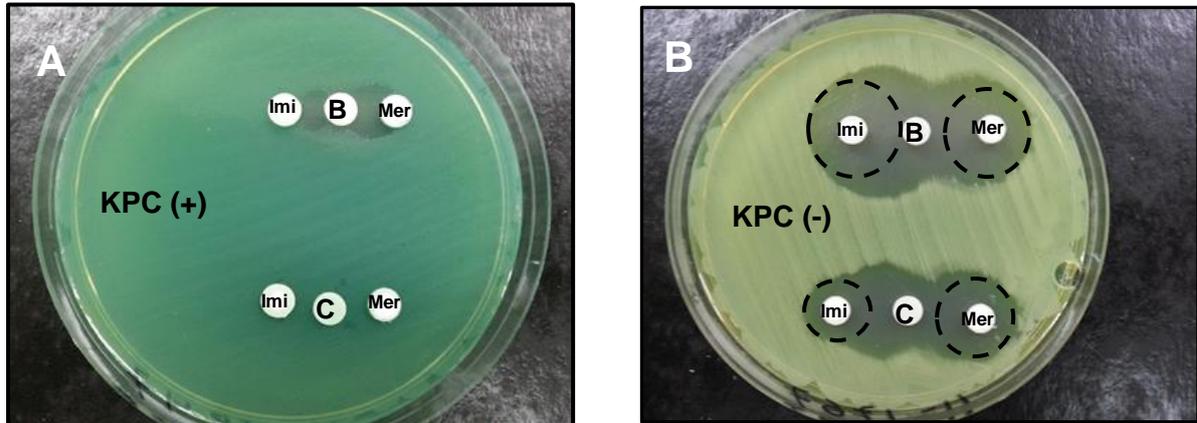


Figura 34: Test de Sinergia. A: Cepa productora de KPC. **B:** Cepa KPC negativa. Imipenem (IMI), ácido borónico (B), meropenem (Mer) y cloxacilina (C).

En las **tabla 20** y **21** se encuentran descritos los resultados obtenidos para el *test* de sinergia entre los carbapenemes imipenem o meropenem y los inhibidores evaluados (ácido borónico y cloxacilina).

	Imipenem			
	Sinergia con ácido borónico (+) y sinergia con cloxacilina (-)	Sinergia con ácido borónico (+) y sinergia con cloxacilina (+)	Sinergia con ácido borónico (-) y sinergia con cloxacilina (-)	Sinergia con ácido borónico (-) y sinergia con cloxacilina (+)
Cepas productoras de KPC (n=34)	25 (PV)	0 (FN)	9 (RI)	0 (RI)
Cepas KPC negativas (n=39)	0 (FP)	39 (NV)	0 (RI)	0 (RI)
Cepas productoras de metalo-β-lactamasas (n=4)	1 (FP)	0 (NV)	3 (RI)	0 (RI)

Tabla 20: Resultados del test de sinergia con imipenem. PV: positivos verdaderos; FP: falsos positivos; FN: falsos negativos; NV: negativos verdaderos y RI: resultados indeterminados.

	Meropenem			
	Sinergia con ácido borónico (+) y sinergia con cloxacilina (-)	Sinergia con ácido borónico (+) y sinergia con cloxacilina (+)	Sinergia con ácido borónico (-) y sinergia con cloxacilina (-)	Sinergia con ácido borónico (-) y sinergia con cloxacilina (+)
Cepas productoras de KPC (n=34)	34 (PV)	0 (FN)	0 (RI)	0 (RI)
Cepas KPC negativas (n=39)	3 (FP)	23 (NV)	10 (RI)	3 (RI)
Cepas productoras de metalo-β-lactamasas (n=4)	1 (FP)	0 (NV)	2 (RI)	1 (RI)

Tabla 21: Resultados del test de sinergia con meropenem. PV: positivos verdaderos; FP: falsos positivos; FN: falsos negativos; NV: negativos verdaderos y RI: resultados indeterminados.

R7.2. Test de Discos combinados

En la **Figura 35** se encuentran representados los halos de inhibición obtenidos en este *test*, tanto del antibiótico solo como combinado con los distintos inhibidores evaluados. Al igual que en el *test* de sinergia, ninguna de las cepas KPC positivas fue inhibida por cloxacilina. Por consiguiente en ambos *test* no hubo falsos negativos.

Se consideró inhibición con ácido borónico positiva, si la diferencia entre los halos del antimicrobiano solo y del antimicrobiano con inhibidor fue ≥ 4 mm. El punto de corte para cloxacilina fue ≥ 3 mm (**Figura 36**), siendo los perfiles esperados los mismos que en el *test* de sinergia.

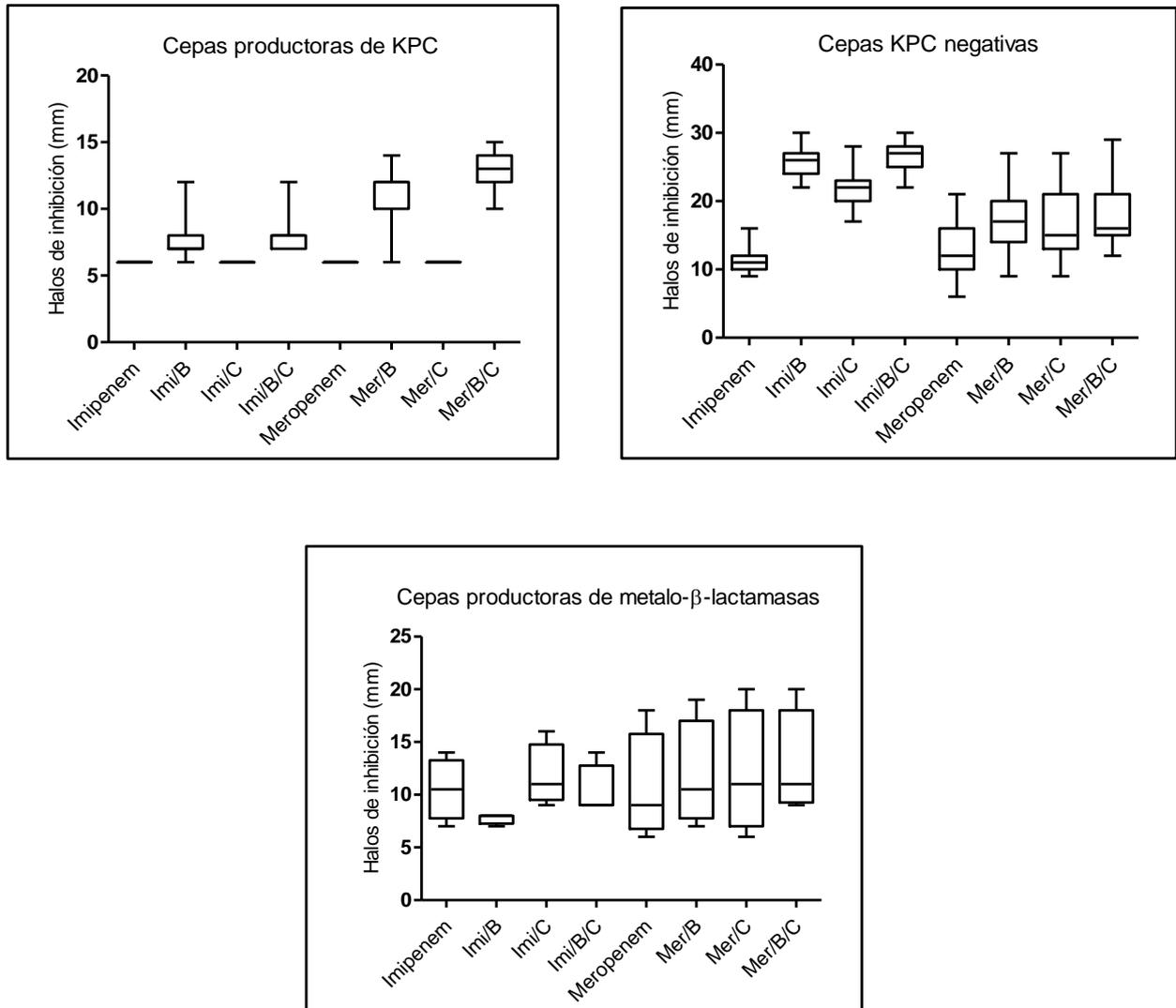


Figura 35: Resultados del *test* de discos combinados: Halos de inhibición (mm) del antibiótico con y sin inhibidor.

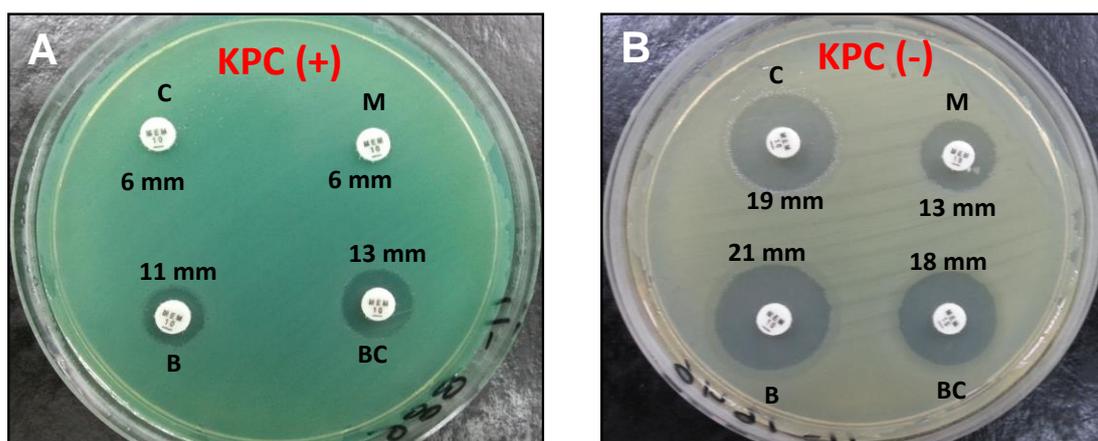


Figura 36: Test de Discos combinados. **A:** Cepa productora de KPC. **B:** Cepa KPC negativa. Imipenem (IMI), ácido borónico (B), meropenem (Mer), cloxacilina (C) y ácido borónico/cloxacilina (BC).

Las **tablas 22 y 23** detallan los resultados obtenidos en el *test de discos combinados*, para ambos carbapenemes en relación a los dos inhibidores evaluados (ácido borónico y cloxacilina). Se hicieron las mismas consideraciones de clasificación que en el *test de sinergia*.

	Imipenem			
	Delta con ácido borónico (+) y delta con cloxacilina (-)	Delta con ácido borónico (+) y delta con cloxacilina (+)	Delta con ácido borónico (-) y delta con cloxacilina (-)	Delta con ácido borónico (-) y delta con cloxacilina (+)
Cepas productoras de KPC (n=34)	5 (PV)	0 (FN)	29 (RI)	0 (RI)
Cepas KPC negativas (n=39)	0 (FP)	39 (NV)	0 (RI)	0 (RI)
Cepas productoras de metalo-β-lactamasas (n=4)	0 (FP)	0 (NV)	4 (RI)	0 (RI)

Tabla 22: Resultados del test de Discos combinados con imipenem. PV: positivos verdaderos; FP: falsos positivos; FN: falsos negativos; NV: negativos verdaderos y RI: resultados indeterminados.

	Meropenem			
	Delta con ácido borónico (+) y delta con cloxacilina (-)	Delta con ácido borónico (+) y delta con cloxacilina (+)	Delta con ácido borónico (-) y delta con cloxacilina (-)	Delta con ácido borónico (-) y delta con cloxacilina (+)
Cepas productoras de KPC (n=34)	30 (PV)	0 (FN)	4 (RI)	0 (RI)
Cepas KPC negativas (n=39)	1 (FP)	24 (NV)	5 (RI)	9 (RI)
Cepas productoras de metalo- β -lactamasas (n=4)	1 (FP)	0 (NV)	2 (RI)	1 (RI)

Tabla 23: Resultados del test de Discos combinados con meropenem. PV: positivos verdaderos; FP: falsos positivos; FN: falsos negativos; NV: negativos verdaderos y RI: resultados indeterminados.

R7.3. Método de Hodge modificado

A diferencia de los métodos anteriores, Se obtuvieron los mismos resultados para ambos carbapenemes. Este método fue positivo en todas las cepas productoras de KPC, formación de una hendidura en el halo de inhibición del carbapenem. Dentro del grupo de cepas KPC negativas, solo tres dieron un Hodge débil o dudoso. Dichas cepas son productoras de metalo- β -lactamasas, presentando inhibición con EDTA y detección del gen *bla_{VIM}* positivos (**Figura 37** y **Tabla 24**). Se hicieron las mismas consideraciones de clasificación que en los *test* anteriores.

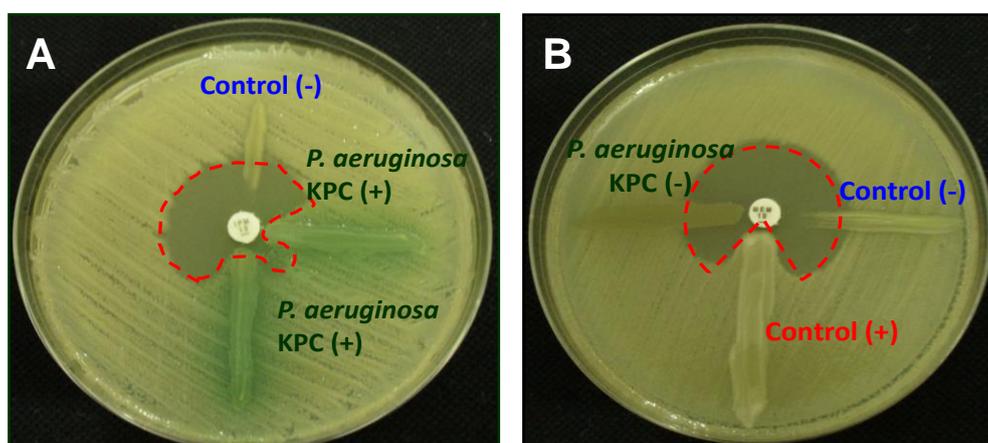


Figura 37: Método de Hodge modificado. A: Cepa productora de KPC. **B:** Cepa KPC negativa.

	Imipenem / Meropenem		
	Test de Hodge (+)	Test de Hodge (-)	Test de Hodge dudoso
Cepas productoras de KPC (n=34)	34 (PV)	0 (FN)	0 (RI)
Cepas KPC negativas (n=39)	0 (FP)	39 (NV)	0 (RI)
Cepas productoras de metalo- β -lactamasas (n=4)	0 (FP)	1 (NV)	3 (RI)

Tabla 24: Resultados del método de Hodge modificado. PV: positivos verdaderos; FP: falsos positivos; FN: falsos negativos; NV: negativos verdaderos y RI: resultados indeterminados.

R7.4. Método Estadístico (Prueba de Friedman)

Al comparar estadísticamente los tres métodos, se obtuvo que el método de Hodge modificado difiere significativamente de los otros *test* evaluados (**Tabla 25**).

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	N°		
Sinergia Imi/Mero	151,00	1,96	77	A	
Disco combinados Imi/Mero	151,50	1,97	77	A	B
Met. de Hodge	159,50	2,07	77		C

Tabla 25: Test estadístico de Friedman aplicado a los tres métodos evaluados.

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Dentro del *test* de sinergia, al comparar la efectividad de los carbapenemes en el *screening* de KPC, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Sin embargo si discriminamos entre aislamientos KPC (+) y KPC (-), se observa diferencias significativas ($p < 0,01$). Meropenem mostro mejor desempeño que imipenem en la detección de KPC, 34 positivos verdaderos versus 25 PV más 9 resultados indeterminados. Mientras que imipenem presento mayor eficacia para descartar KPC, 39 negativos verdaderos, 3 resultados indeterminados y un falso positivo frente a 23 NV, 16 RI y 4 FP.

Resultados similares se obtuvieron en el *test* de discos combinados. Al comparar entre ambos carbapenemes, no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$). No obstante al segregar en KPC (+) y KPC (-) se observó diferencia ($p < 0,001$). En la

detección de KPC, meropenem presento 30 positivos verdaderos con 4 resultados indeterminados, en tanto que imipenem solo detecto 5 aislamientos positivos y presento 29 RI. Al igual que en el *test* de sinergia el mejor carbapenem para descartar la presencia de KPC fue imipenem, el cual presento 39 negativos verdaderos con 4 resultados indeterminados, a diferencia de meropenem que tuvo 24 NV, 17 RI y 2 FP.

R8. Resistencia a Colistina

Los resultados de la evaluación de colistina tanto en la cepa sensible como en la resistente, se muestran en la **Tabla 26** y **Figura 38**.

	<i>P. aeruginosa</i> productora de KPC sensible a colistina	<i>P. aeruginosa</i> productora de KPC resistente a colistina
Difusión por discos (mm)	15	10
<i>Etest</i> ($\mu\text{g/mL}$)	1	6
VITEK® 2 Compact ($\mu\text{g/mL}$)	2	8
Microdilución en caldo ($\mu\text{g/mL}$)	2	16

Tabla 26: Valores de colistina por los diferentes métodos evaluados.



Figura 38: Método de difusión por discos e *Etest* para colistina. **A:** *P. aeruginosa* productora de KPC sensible a colistina (CT). **B:** *P. aeruginosa* productora de KPC resistente a colistina.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

Las enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) tienen un alto impacto clínico por varias razones: Debido a su localización plasmídica se han diseminado mundialmente (Sennati *et al.* 2012), a su vez dicho plásmido acarrea otros mecanismos de resistencia disminuyendo las opciones terapéuticas (Oteo *et al.* 2014). Finalmente la implementación de una terapia antimicrobiana inicial inadecuada es un factor de riesgo que incrementa la morbimortalidad. Otro mecanismo causal de resistencia a cefalosporinas son las β -lactamasas tipo AmpC. Si bien son menos frecuente que las BLEE (Alvarez *et al.* 2004), pueden causar fracasos terapéuticos en el tratamiento con cefalosporinas de cuarta generación. Siendo los carbapenemes, los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones por estos microorganismos (Oteo *et al.* 2010). Esta problemática ha conllevado a un mayor uso de los mismos.

En el año 2009 comenzamos a observar en nuestra institución un aumento del porcentaje de resistencia a carbapenemes en *P. aeruginosa*, así como variaciones en los fenotipos de resistencias, esto nos llevó a evaluar nuestra situación epidemiológica. Este conocimiento es esencial para poder controlar y prevenir la aparición de nuevos mecanismos de resistencia y conservar la vida útil de los antibióticos existentes, aplicando tratamientos empíricos adecuados y un correcto uso de los antimicrobianos en nuestro hospital.

En este trabajo se observó que los niveles de resistencia a los antibióticos antipseudomonales se mantuvieron relativamente estables, excepto en cefepime, imipenem y meropenem (**Figura 22**). En nuestro hospital la resistencia a dichos antibióticos prácticamente se duplicó en un período relativamente corto de tiempo, similar a lo reportado mundialmente y principalmente en América Latina (Andrade *et al.* 2003; Davies *et al.* 2011). En concordancia a dicho incremento hubo variaciones en los perfiles de resistencia observados en el segundo período, mostrando como principal fenotipo la resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, seguido de la resistencia conjunta a imipenem y meropenem (**Figura 23**). Los perfiles de resistencias que observamos y su variación a lo largo de los períodos evaluados, nos permiten sugerir ciertas hipótesis.

Por un lado hubo una disminución del porcentaje de cepas multisensibles y en paralelo se incrementó la resistencia conjunta a los carbapenemes. Este hecho podría deberse a una adquisición secuencial de mecanismos de resistencia. En primera instancia

la pérdida de OprD, el cual es un mecanismo altamente frecuente, asociado a la resistencia a imipenem. En un segundo paso estas cepas podrían haber adquirido otros mecanismos, tales como incremento en los sistemas de expulsión o eflujo, responsables de la resistencia a meropenem y otros antibióticos. Resultados similares fueron reportados por otros autores (Davies *et al.* 2011). Otra hipótesis puede ser el camino inverso, microorganismos con hiperproducción de AmpC o bombas de eflujo, habrían perdido la porina OprD transformándose en multiresistentes, la asociación entre estos mecanismos de resistencia ya ha sido reportada en la bibliografía (Livermore 2002; Cabot *et al.* 2011).

A su vez se observó que la resistencia a los antibióticos no- β -lactámicos fue significativamente mayor en aislamientos con resistencia múltiple a los β -lactámicos que en aquellos sensibles a los mismos, reduciéndose notablemente las opciones terapéuticas.

Estas variaciones genéticas y fenotípicas podrían ser el resultado de la presión selectiva, debida a un incremento o uso inapropiado de los carbapenemes a lo largo de estos últimos años en nuestro hospital. Distintos estudios epidemiológicos evaluaron la relación entre la presión ejercida por los antibióticos y la aparición de nuevos mecanismos de resistencia y/o incrementó de los mismos (McLaughlin *et al.* 2013; Sedlakova *et al.* 2014). Con la finalidad de determinar si existía alguna relación entre este incremento y el consumo de carbapenemes, se calculó el mismo en Dosis Diaria Definida (DDD) por 1.000 pacientes/día (Apartado **M3.3**). Este análisis arrojó un incremento estadísticamente significativo en el consumo de imipenem, mientras que el de meropenem se mantuvo estable. Estos resultados podrían explicar la asociación entre el consumo de imipenem y el porcentaje de resistencia a carbapenemes encontrados en nuestra institución. Resultados similares fueron reportados por Lepper *et al.* (2002).

En relación a la asociación antibiótico-resistencia, durante este trabajo se aisló una cepa de *P. aeruginosa* productora de KPC resistente a colistina, siendo dicha resistencia poco frecuente, menor al 5% (Falagas *et al.* 2010). Este aislamiento se obtuvo de un paciente que ingresó al hospital por *shock* séptico secundario a peritonitis. En el transcurso de la internación tuvo bacteriemia por Kpn-KPC solo sensible a colistina y tigeciclina, por esta razón fue tratado con colistina y amoxicilina sulbactam. A los 20 días de tratamiento el paciente desarrolló una infección urinaria por *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, ambas productoras de KPC y resistentes a colistina. La cepa Pae-KPC pertenece al ST 654 el cual es endémico en nuestro hospital (García Ramírez *et al.* 2013). Este incremento de la resistencia podría ser debido a la presión selectiva ejercida por el mayor uso de colistina. A su vez la farmacocinética y farmacodinamia de colistina no están bien dilucidadas, por lo

que en algunos casos se usan concentraciones subletales que generan resistencia. Esto ha sido documentado en Kpn-KPC, incluso en nuestro hospital (Antoniadou *et al.* 2007; Arduino *et al.* 2009; Marchaim *et al.* 2011).

A diferencia de los otros antibióticos antipseudomonales, en nuestra institución se observó que la amikacina conservó la mayor actividad (16-18% de resistencia), por lo que podría ser utilizada dependiendo de las características del paciente, tipo de infección (tracto urinario) y combinación con otros antimicrobianos. De esta manera se podría disminuir el uso de los carbapenemes y preservar dichos antibióticos, ya que está demostrado que la disminución en el consumo de ciertos antimicrobianos afecta los porcentajes de resistencia y perfiles fenotípicos (Ogutlu *et al.* 2014).

Como mencionamos al inicio de la discusión el uso incorrecto de los antimicrobianos, no solo genera aumento de la resistencia por incremento de mecanismos de resistencia ya existentes en la especie en estudio, sino que la presión ejercida hace que las bacterias adquieran nuevos mecanismos. Este fenómeno se ve favorecido por la capacidad de las bacterias de intercambiar ADN a través de elementos móviles. Una bacteria que particularmente se caracteriza por poseer una gran capacidad de adquirir mecanismos de resistencia es *K. pneumoniae*, en la misma la presencia de carbapenemasas tipo KPC es más frecuente que en otras enterobacterias (Chen *et al.* 2014b). La proporción de Kpn-KPC varía geográficamente, en nuestro país se ha vuelto endémica, mientras que en otros países por ahora solo presentan casos esporádicos o importados (Munoz-Price *et al.* 2013). A su vez dentro de la Argentina su distribución es variable, siendo Buenos Aires la zona con mayor porcentaje de KPC, alcanzando hasta un 25% (**Figura 39**). De ahí radica la importancia de evaluar localmente la situación epidemiológica y en base a eso aplicar medidas de control y de tratamiento empírico adecuadas a nuestra realidad.

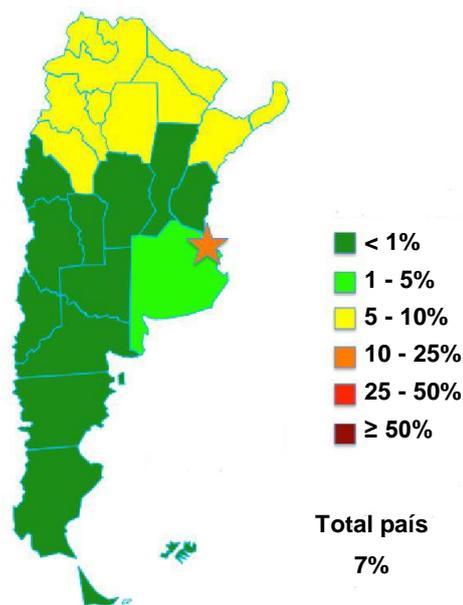


Figura 39: Aislamientos de Kpn-KPC provenientes de hemocultivos, 2013. Tomado de Pasteran *et al.* (2015).

A partir del 2009, en la ciudad de Buenos Aires se produjeron varios brotes en distintos centros hospitalarios. Particularmente en nuestro hospital se detectó el primer aislamiento de *K. pneumoniae* productora de KPC en enero del 2009, no obstante fue considerado como un caso importado por corresponder a un paciente de atención ambulatoria. Pocos meses más en tarde, en junio del 2009 se aisló la primera cepa de Kpn-KPC proveniente de un paciente internado en nuestra institución, considerándolo como caso índice (Arduino *et al.* 2010). Por lo mencionado anteriormente, en este trabajo se evaluó el comportamiento de este mecanismo de resistencia a lo largo del tiempo. Dicho análisis arrojó que a partir del caso índice la producción de KPC se incrementó significativamente, alcanzando un nivel de resistencia del 43% en el mes de noviembre. Si bien dicha elevación fue significativa, mediante la técnica de CUSUM confirmamos que dicho incremento se correspondía a un brote epidémico. A su vez Arduino *et al.* (2010) evaluó la relación clonal de dichos aislamientos, en la cual se evidenció la preponderancia de un clon. A pesar de que no se estudió a que secuencia tipo pertenecía, podemos suponer que se trata del ST 258, ya que esta variante es endémica en nuestro país y es la principal responsable de los brotes en la ciudad de Buenos Aires.

Existen distintas medidas que se pueden aplicar para controlar un brote de estas características: Control adecuado de los antimicrobianos, detección de pacientes colonizados y un rápido diagnóstico de los casos de Kpn-KPC (Dortet *et al.* 2013; Delory *et al.* 2015). En nuestro laboratorio instauramos las medidas de control recomendadas. Sin embargo con posterioridad mediante la técnica de CUSUM pusimos de manifiesto dos brotes más a lo largo del período evaluado (11-2010 y 10-2011), además el porcentaje anual de Kpn-KPC rondó en el 16% (12 aislamientos por mes). Por lo que podemos conjeturar que existe algún reservorio de este mecanismo que aún no hemos detectado.

Teniendo en consideración la problemática que representaba el aumento de aislamientos Kpn-KPC en nuestro hospital, se intensificó desde el laboratorio la búsqueda de este mecanismo, incluyendo a *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, donde también ha sido descrito. Gracias a dicha búsqueda el 16 de julio del 2010 detectamos una cepa de *P. aeruginosa*, proveniente de un urocultivo, productora de KPC (ST654). Este hallazgo nos llevó a indagar cuando y como se produjo la aparición de este mecanismo de resistencia en *P. aeruginosa*, el cual pasó inadvertido en el procesamiento de la rutina diaria. Este estudio arrojó resultados relevantes:

- El origen de la Pae-KPC (ST654) no ha sido establecido. Pasteran *et al.* (2012) proponen que el pasaje de esta carbapenemasa desde enterobacterias a *P. aeruginosa*, es poco probable. Asimismo en nuestro hospital, la adquisición de KPC por *P. aeruginosa* fue cercana a la aparición de la misma en *K. pneumoniae*. Esto nos lleva a pensar que la fuerte presión selectiva ejercida por el incremento del consumo de imipenem, podría haber sido una de las causas del establecimiento de estos clones portadores de KPC en nuestra institución.
- En este trabajo el porcentaje de Pae-KPC fue del 18%, similar a lo obtenido en *K. pneumoniae*. Dicho porcentaje es un valor relativamente alto si lo comparamos con lo reportado en la literatura, donde encontramos frecuencias que varían entre 5% y 16% dependiendo de la zona geográfica (Vanegas *et al.* 2014). Si tenemos en cuenta solamente los aislamientos resistentes a los carbapenemes, el 44% de ellos es productor de KPC. De lo cual se puede concluir que la KPC no solo es un mecanismo emergente, sino que también es una importante fuente de resistencia a los carbapenemes en nuestra población.

Teniendo en cuenta la alta prevalencia de Pae-KPC en nuestra institución, se comenzó a estudiar el perfil de variación que presentaba este mecanismo de resistencia a lo largo del tiempo. Este análisis mostro la existencia de un único punto de inflexión o brote a partir del cual el proceso nunca logro ser controlado (**Figura 32**). Por lo que Pae-KPC puede

ser considerada como un reservorio de este mecanismo de resistencia transmisible en nuestro hospital. Si relacionamos estos resultados con el patrón fluctuante de KPC en *K. pneumoniae*, podemos postular que la presencia de Pae-KPC no detectada, podría ser una de las probables fuentes de este mecanismo de resistencia que da lugar a los sucesivos brotes de Kpn-KPC. Teniendo en cuenta que la epidemiología de KPC en *P. aeruginosa* es tan compleja como en *K. pneumoniae*, siendo diseminada en diferentes estructuras génicas, plásmidos y clones. Un ejemplo de ello es el hallazgo de *bla*_{KPC-2} en el plásmido IncP-6, el cual posee la capacidad de replicarse tanto en *Pseudomonas* como en *Enterobacteriaceae* (Wolter *et al.* 2009a; Cuzon *et al.* 2011; Pasteran *et al.* 2012; Naas *et al.* 2013; Rizek *et al.* 2014; Hu *et al.* 2015).

Gracias al estudio de las diferentes plataformas génicas de KPC y de su relación clonal, se puede seguir la diseminación de los mismos geográficamente. Del análisis del entorno genético de KPC se obtuvo que en nuestros aislamientos, el gen *bla*_{KPC-2} era transportado por el transposón Tn4401 b. Los mismos mostraron idéntico patrón de bandas en REP-PCR y pertenecen al secuenciotipo ST 654, el cual predomina actualmente en nuestro país. Por el momento la distribución de Pae-KPC se encuentra limitada a ciertas áreas geográficas, sin embargo este es un proceso dinámico y en constante evolución. Por lo tanto es importante seguir realizando este tipo de estudios epidemiológicos.

Otra característica importante de nuestros aislamientos son sus elevados valores de CIM a carbapenemes (mayores a 128 µg/mL). La conjunción de KPC y pérdida de OprD, podrían explicar los altos niveles de CIMs encontrados, como ya han reportado otros autores (Wolter *et al.* 2009a; Cuzon *et al.* 2011).

Considerando todos los puntos anteriormente mencionados, alta frecuencia, niveles de resistencia, importancia epidemiológica, etc. Es que creemos sumamente importante buscar la carbapenemasa tipo KPC en *P. aeruginosa* con el mismo énfasis que en enterobacterias. El inconveniente que se plantea es su difícil detección fenotípica.

La primera pauta de alarma para sospechar la presencia de Pae-KPC en nuestra institución es su característico perfil fenotípico, alta resistencia a los antibióticos antipseudomonales. La CIM₅₀ a ceftazidima fue de 32 µg/mL, con respecto a los carbapenemes, los halos de inhibición fueron de 6 mm y valores de CIM mayores a 128 µg/mL. Siendo los aminoglucósidos y colistina los únicos antibióticos que conservan su actividad (**Tabla 13, Figura 27 y Figura 28**).

A las probables cepas portadoras del gen *bla*_{KPC} se les debe realizar un *test de screening*. La comparación de los diferentes métodos evaluados arrojó que el *test* con mejor

rendimiento fue el Hodge modificado. El cual logro detectar todos los aislamientos de Pae-KPC y solo tres cepas KPC negativas dieron un Hodge débil o dudoso. Estas últimas tenían metalo- β -lactamasas, fácilmente detectadas mediante la inhibición con EDTA o PCR.

Con respecto a los otros métodos estudiados el *test* de sinergia y de discos combinados, ambos se comportaron en forma similar. Como ventaja no tuvieron falsos negativos, puesto que ninguna de las cepas KPC positivas fue inhibida por cloxacilina. Sin embargo presentaron mayor número de resultados indeterminados y falsos positivos con respecto al *test* de Hodge. Si se utilizan estos métodos deben realizarse con ambos carbapenemes, ya que existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Meropenem mostro mejor desempeño en la detección de Pae-KPC, mientras que imipenem fue más eficaz en descartar KPC.

Además de lo anteriormente mencionado es importante disminuir la resistencia y preservar la vida útil de los antibióticos, debido a que no hay muchos antibióticos nuevos en desarrollo y la pérdida de los mismos afectaría la práctica diaria. Las infecciones por microorganismos resistentes a carbapenemes o colistina son un gran problema en el ámbito de la salud. Dichas infecciones requieren tratamientos más tóxicos con peor pronóstico (Zarkotou *et al.* 2010; Lemos *et al.* 2014). Asimismo Smith and Coast (2013) reportaron que el costo de la resistencia antimicrobiana por año en Estados Unidos, es de 55.000 millones USD (20.000 millones en costos de servicios de salud y 35.000 millones en pérdida de productividad).

Del análisis global de los resultados surge que el clon de *P. aeruginosa* productor de KPC ST 654, no solo logro diseminarse y permanecer en nuestra institución, sino que también es el clon predominante en nuestro país. Por lo cual a futuro nos proponemos estudiar cuales son los factores de patogenicidad que lo han vuelto tan exitoso.

RESUMEN

En este trabajo se evaluaron los perfiles de resistencia a antibióticos antipseudomonales en *P. aeruginosa* en el Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno" (CEMIC). Se observó que los niveles de resistencia a cefepime, imipenem y meropenem prácticamente se duplicaron en un período relativamente corto de tiempo (2000-2004 con respecto a 2005-2008). En concordancia a los resultados anteriores hubo variaciones en los perfiles de resistencia, siendo el principal fenotipo la resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos, seguido de la resistencia conjunta a imipenem y meropenem. Este hecho podría deberse a la pérdida de OprD, seguido de eflujo o viceversa. Estas variaciones podrían ser el resultado de la presión selectiva, debida a un incremento o uso inapropiado de los carbapenemes, ya que se observó un aumento estadísticamente significativo del consumo de imipenem expresado en Dosis Diaria Definida por 1.000 pacientes/día en nuestra institución, a lo largo de estos últimos años.

A su vez se detectó un porcentaje de *P. aeruginosa* productora de KPC (Pae-KPC) del 18%, un valor relativamente alto comparado con lo reportado en la literatura. Si solo consideramos los aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a los carbapenemes, el 44% de ellos es productor de KPC. De lo cual se puede concluir que la KPC no solo es un mecanismo emergente, sino que también es una importante fuente de resistencia a los carbapenemes en nuestra población. Mediante la técnica de CUSUM se demostró la existencia de un único brote dentro del período evaluado, a partir del cual el proceso nunca logro ser controlado. A su vez todos los aislamientos pertenecen al secuenciotipo ST 654. Por lo que la Pae-KPC podría ser el reservorio de este mecanismo de resistencia transmisible en nuestro hospital y una de las probables fuentes que da lugar a los sucesivos brotes de Kpn-KPC.

Del estudio de sensibilidad realizado en este trabajo, se desprende que la primera pauta de alarma para sospechar la presencia de Pae-KPC en nuestra institución es su característico perfil fenotípico. Alta resistencia a los antibióticos antipseudomonales, valores de CIM a carbapenemes mayores a 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sensibilidad a aminoglucósidos y colistina. Los altos niveles de resistencia de las Pae-KPC, podrían estar asociados a la presencia de otros mecanismos de resistencia como la pérdida de OprD. A las probables cepas portadoras del gen *bla*_{KPC} se les debe realizar el *test* de *screening*., según nuestro estudio el método con mejor rendimiento es el *test* de Hodge modificado.

Del análisis global de los resultados surge que el clon de *P. aeruginosa* productor de KPC ST 654, no solo logro diseminarse y permanecer en nuestra institución, sino que también es el clon predominante en nuestro país. Por lo cual a futuro nos proponemos estudiar cuales son los factores de patogenicidad que lo han vuelto tan exitoso.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

Akova, M., G. L. Daikos, L. Tzouvelekis & Y. Carmeli (2012). "Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria." *Clin Microbiol Infect* **18**(5), 439-448.

Alvarez, M., J. H. Tran, N. Chow & G. A. Jacoby (2004). "Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the United States." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(2), 533-537.

Ambler, R. P. (1980). "The structure of beta-lactamases." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**(1036), 321-331.

Andrade, S. S., R. N. Jones, A. C. Gales & H. S. Sader (2003). "Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001)." *J Antimicrob Chemother* **52**(1), 140-141.

Antoniadou, A., F. Kontopidou, G. Poulakou, E. Koratzanis, I. Galani, E. Papadomichelakis, P. Kopterides, M. Souli, A. Armaganidis & H. Giamarellou (2007). "Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster." *J Antimicrob Chemother* **59**(4), 786-790.

Arduino, S., F. Nicola, S. Relloso, S. Zarate, G. R. D., J. Nievas, P. Bonvehí & J. Smayevsky (2010). Emergence of KPC-Producing *Enterobacteriaceae* in a Teaching Hospital from Buenos Aires, Argentina: Dissemination of a Multiclonal Cluster. Abstr C-2578. . *110th General Meeting of the American Society for Microbiology (ASM)*. San Diego, United States.

Arduino, S., M. P. Quiroga, S. Relloso, D. García, M. S. Ramirez, F. Nicola, D. Centron, P. Bonvehí & J. Smayevsky (2009). Clonal Spread of Colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* During Extensive Use of Colistin for Multiresistant Bacteria Treatment. Abstract 848. *Annual Meeting of the Infectious Diseases Society of America (IDSA)*. Philadelphia, United States.

Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris & M. Turck (1966). "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method." *Am J Clin Pathol* **45**(4), 493-496.

Bebrone, C., P. Bogaerts, H. Delbruck, S. Bennink, M. B. Kupper, R. Rezende de Castro, Y. Glupczynski & K. M. Hoffmann (2013). "GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-Type beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues." *Antimicrob Agents Chemother* **57**(1), 396-401.

Ben-David, D., Y. Maor, N. Keller, G. Regev-Yochay, I. Tal, D. Shachar, A. Zlotkin, G. Smollan & G. Rahav (2010). "Potential role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection." *Infect Control Hosp Epidemiol* **31**(6), 620-626.

Bush, K., G. A. Jacoby & A. A. Medeiros (1995). "A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure." *Antimicrob Agents Chemother* **39**(6), 1211-1233.

Cabot, G., A. A. Ocampo-Sosa, F. Tubau, M. D. Macia, C. Rodriguez, B. Moya, L. Zamorano, C. Suarez, C. Pena, L. Martinez-Martinez other authors (2011). "Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(5), 1906-1911.

Castanheira, M., A. J. Costello, L. M. Deshpande & R. N. Jones (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; author reply 1670-1661.

Castanheira, M., L. M. Deshpande, A. Costello, T. A. Davies & R. N. Jones (2014). "Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries." *J Antimicrob Chemother* **69**(7), 1804-1814.

Castanheira, M., M. A. Toleman, R. N. Jones, F. J. Schmidt & T. R. Walsh (2004). "Molecular characterization of a beta-lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(12), 4654-4661.

CLSI (2013). "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 23st informational supplement. CLSI document M02-A11, M07-A9, and M11-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA."

Curiao, T., M. I. Morosini, P. Ruiz-Garbajosa, A. Robustillo, F. Baquero, T. M. Coque & R. Canton (2010). "Emergence of bla KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain." *J Antimicrob Chemother* **65**(8), 1608-1614.

Curran, B., D. Jonas, H. Grundmann, T. Pitt & C. G. Dowson (2004). "Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*." *J Clin Microbiol* **42**(12), 5644-5649.

Cuzon, G., T. Naas, M. V. Villegas, A. Correa, J. P. Quinn & P. Nordmann (2011). "Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing beta-lactamase blaKPC-2 gene in Colombia." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(11), 5350-5353.

Chen, L., K. D. Chavda, R. G. Melano, M. R. Jacobs, B. Koll, T. Hong, A. D. Rojzman, M. H. Levi, R. A. Bonomo & B. N. Kreiswirth (2014a). "Comparative genomic analysis of KPC-encoding pKpQIL-like plasmids and their distribution in New Jersey and New York Hospitals." *Antimicrob Agents Chemother* **58**(5), 2871-2877.

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

Davies, T. A., A. Marie Queenan, B. J. Morrow, W. Shang, K. Amsler, W. He, A. S. Lynch, C. Pillar & R. K. Flamm (2011). "Longitudinal survey of carbapenem resistance and resistance mechanisms in Enterobacteriaceae and non-fermenters from the USA in 2007-09." *J Antimicrob Chemother* **66**(10), 2298-2307.

Delory, T., E. Seringe, G. Antoniotti, I. Novakova, C. Goulenok, I. Paysant, S. Boyer, A. Carbonne, T. Naas & P. Astagneau (2015). "Prolonged delay for controlling KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak: The role of clinical management." *Am J Infect Control.*

Di Conza, J. A. & G. O. Gutkind (2010). "Integrases: los coleccionistas de genes." *Revista Argentina de Microbiología* **42**, 63-78.

Didelot, X. & D. Falush (2007). "Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data." *Genetics* **175**(3), 1251-1266.

Dortet, L., L. Poirel' & P. Nordmann (2013). "Épidémiologie, détection et identification des entérobactéries productrices de carbapénémases." *feuilles de Biologie* **313**, 5-12.

Echeverri Toro, L. M. & J. C. Cataño Correa (2010). "Klebsiella pneumoniae como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia." *Revista médica Universidad de Antioquia* **23**(3), 240-249.

El Amin, N., C. G. Giske, S. Jalal, B. Keijser, G. Kronvall & B. Wretling (2005). "Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: alterations of porin OprD and efflux proteins do not fully explain resistance patterns observed in clinical isolates." *APMIS* **113**(3), 187-196.

Falagas, M. E., P. I. Rafailidis & D. K. Matthaiou (2010). "Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options." *Drug Resist Updat* **13**(4-5), 132-138.

Fernández-Cuenca, F. (2004). "Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **22**(6), 355-360.

Fernandez, L. & R. E. Hancock (2012). "Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance." *Clin Microbiol Rev* **25**(4), 661-681.

Fisher, J. F. & S. Mobashery (2014). "The sentinel role of peptidoglycan recycling in the beta-lactam resistance of the Gram-negative Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*." *Bioorg Chem* **56C**, 41-48.

Fowler, R. C. & N. D. Hanson (2014). "Emergence of carbapenem resistance due to the novel insertion sequence ISPa8 in *Pseudomonas aeruginosa*." *PLoS One* **9**(3), e91299.

Foxman, B., L. Zhang, J. S. Koopman, S. D. Manning & C. F. Marrs (2005). "Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies." *Epidemiol Perspect Innov* **2**, 10.

Gales, A. C., M. Castanheira, R. N. Jones & H. S. Sader (2012). "Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010)." *Diagn Microbiol Infect Dis* **73**(4), 354-360.

Garcia Ramirez, D., F. Nicola, S. Zarate, S. Relloso, J. Smayevsky & S. Arduino (2013). "Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* with KPC-type carbapenemase in a teaching hospital: an 8-year study." *J Med Microbiol* **62**(Pt 10), 1565-1570.

Goering, R. V. (2010). "Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease." *Infect Genet Evol* **10**(7), 866-875.

Goldstein, E. J., D. M. Citron, V. Peraino, T. Elgourt, A. R. Meibohm & S. Lu (2009). "Introduction of ertapenem into a hospital formulary: effect on antimicrobial usage and improved in vitro susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(12), 5122-5126.

Gomez, S. A., F. G. Pasteran, D. Faccone, N. Tijet, M. Rapoport, C. Lucero, O. Lastovetska, E. Albornoz, M. Galas, R. G. Melano other authors (2011). "Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina." *Clin Microbiol Infect* **17**(10), 1520-1524.

Hu, Y. Y., D. X. Gu, J. C. Cai, H. W. Zhou & R. Zhang (2015). "Emergence of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 463 isolates in Hangzhou, China." *Antimicrob Agents Chemother* **59**(5), 2914-2917.

Jacoby, G. A. (2009). "AmpC beta-lactamases." *Clin Microbiol Rev* **22**(1), 161-182, Table of Contents.

- June, C. M., B. C. Vallier, R. A. Bonomo, D. A. Leonard & R. A. Powers (2014).** "Structural origins of oxacillinase specificity in class D beta-lactamases." *Antimicrob Agents Chemother* **58**(1), 333-341.
- Kattan, J. N., M. V. Villegas & J. P. Quinn (2008).** "New developments in carbapenems." *Clin Microbiol Infect* **14**(12), 1102-1111.
- Kidd, T. J., K. Grimwood, K. A. Ramsay, P. B. Rainey & S. C. Bell (2011).** "Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis." *J Clin Microbiol* **49**(1), 263-268.
- Kleckner, N. (1981).** "Transposable elements in prokaryotes." *Annu Rev Genet* **15**, 341-404.
- Lemos, E. V., F. P. de la Hoz, N. Alvis, T. R. Einarson, E. Quevedo, C. Castaneda, Y. Leon, C. Amado, O. Canon & K. Kawai (2014).** "Impact of carbapenem resistance on clinical and economic outcomes among patients with *Acinetobacter baumannii* infection in Colombia." *Clin Microbiol Infect* **20**(2), 174-180.
- Lepper, P. M., E. Grusa, H. Reichl, J. Hogel & M. Trautmann (2002).** "Consumption of imipenem correlates with beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(9), 2920-2925.
- Li, H., Y. F. Luo, B. J. Williams, T. S. Blackwell & C. M. Xie (2012).** "Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies." *Int J Med Microbiol* **302**(2), 63-68.
- Lister, P. D., D. J. Wolter & N. D. Hanson (2009).** "Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms." *Clin Microbiol Rev* **22**(4), 582-610.
- Livermore, D. M. (2002).** "Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?" *Clin Infect Dis* **34**(5), 634-640.
- Marchaim, D., T. Chopra, J. M. Pogue, F. Perez, A. M. Hujer, S. Rudin, A. Endimiani, S. Navon-Venezia, J. Hothi, J. Slim other authors (2011).** "Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(2), 593-599.
- McLaughlin, M., M. R. Advincula, M. Malczynski, C. Qi, M. Bolon & M. H. Scheetz (2013).** "Correlations of antibiotic use and carbapenem resistance in enterobacteriaceae." *Antimicrob Agents Chemother* **57**(10), 5131-5133.
- Morita, Y., J. Tomida & Y. Kawamura (2014).** "Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials." *Front Microbiol* **4**, 422.
- Moya, B., A. Dotsch, C. Juan, J. Blazquez, L. Zamorano, S. Haussler & A. Oliver (2009).** "Beta-lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein." *PLoS Pathog* **5**(3), e1000353.
- Munoz-Price, L. S., L. Poirel, R. A. Bonomo, M. J. Schwaber, G. L. Daikos, M. Cormican, G. Cornaglia, J. Garau, M. Gniadkowski, M. K. Hayden other authors (2013).** "Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases." *Lancet Infect Dis* **13**(9), 785-796.
- Naas, T., R. A. Bonnin, G. Cuzon, M. V. Villegas & P. Nordmann (2013).** "Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*." *J Antimicrob Chemother* **68**(8), 1757-1762.

Naas, T., G. Cuzon, M. V. Villegas, M. F. Lartigue, J. P. Quinn & P. Nordmann (2008). "Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(4), 1257-1263.

Nicolau, C. J. & A. Oliver (2010). "Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **28**(1), 19-28.

Nordmann, P., G. Cuzon & T. Naas (2009). "The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria." *Lancet Infect Dis* **9**(4), 228-236.

Ogutlu, A., E. Guclu, O. Karabay, A. C. Utku, N. Tuna & M. Yahyaoglu (2014). "Effects of Carbapenem consumption on the prevalence of *Acinetobacter* infection in intensive care unit patients." *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **13**, 7.

Oteo, J., E. Miro, M. Perez-Vazquez & F. Navarro (2014). "Evolution of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at the global and national level: what should be expected in the future?" *Enferm Infecc Microbiol Clin* **32 Suppl 4**, 17-23.

Oteo, J., M. Perez-Vazquez & J. Campos (2010). "Extended-spectrum [beta]-lactamase producing *Escherichia coli*: changing epidemiology and clinical impact." *Curr Opin Infect Dis* **23**(4), 320-326.

Pagniez, G., M. Radice, A. Cuirolo, O. Rodriguez, H. Rodriguez, C. Vay, A. Famiglietti & G. Gutkind (2006). "[Prevalence of metallo-beta-lactamase in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* at a university hospital of Buenos Aires City]." *Rev Argent Microbiol* **38**(1), 33-37.

Partridge, S. R. (2011). "Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria." *FEMS Microbiol Rev* **35**(5), 820-855.

Pasteran, F., D. Faccone, S. Gomez, S. De Bunder, F. Spinelli, M. Rapoport, A. Petroni, M. Galas & A. Corso (2012). "Detection of an international multiresistant clone belonging to sequence type 654 involved in the dissemination of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Argentina." *J Antimicrob Chemother* **67**(5), 1291-1293.

Pasteran, F., O. Veliz, D. Faccone, L. Guerriero, M. Rapoport, T. Mendez & A. Corso (2011a). "A simple test for the detection of KPC and metallo-beta-lactamase carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin." *Clin Microbiol Infect* **17**(9), 1438-1441.

Pasteran, F., O. Veliz, M. Rapoport, L. Guerriero & A. Corso (2011b). "Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603." *J Clin Microbiol* **49**(12), 4301-4303.

Pasteran, F. G., A. Corso, M. Monsalvo, J. Frenkel & J. Lazovski. (2015). "Resistencia a los antimicrobianos: causas, consecuencias y perspectivas en Argentina." from <http://antimicrobianos.com.ar/2015/06/resistencia-a-los-antimicrobianos-causas-consecuencias-y-perspectivas-en-argentina/>.

Petersen, J. (2011). "Phylogeny and compatibility: plasmid classification in the genomics era." *Arch Microbiol* **193**(5), 313-321.

Poirel, L., T. Naas & P. Nordmann (2010). "Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases." *Antimicrob Agents Chemother* **54**(1), 24-38.

Poole, K. (2011). "*Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max." *Front Microbiol* **2**, 65.

Reznikoff, W. S. (2008). "Transposon Tn5." *Annu Rev Genet* **42**, 269-286.

Rice, L. B., L. L. Carias, R. A. Hutton, S. D. Rudin, A. Endimiani & R. A. Bonomo (2008). "The KQ element, a complex genetic region conferring transferable resistance to carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(9), 3427-3429.

Riera, E., G. Cabot, X. Mulet, M. Garcia-Castillo, R. del Campo, C. Juan, R. Canton & A. Oliver (2011). "*Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem." *J Antimicrob Chemother* **66**(9), 2022-2027.

Rizek, C., L. Fu, L. Dos Santos, G. Leite, J. Ramos, F. Rossi, T. Guimaraes, A. S. Levin & S. Costa (2014). "Characterization of carbapenem-resistant." *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **13**(1), 43.

Rodriguez-Martinez, J. M., L. Poirel & P. Nordmann (2009). "Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(11), 4783-4788.

Sader, H. S., D. J. Farrell, R. K. Flamm & R. N. Jones (2014). "Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012." *Int J Antimicrob Agents* **43**(4), 328-334.

Schmidtke, A. J. & N. D. Hanson (2008). "Role of ampD homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(11), 3922-3927.

Sedlakova, M. H., K. Urbanek, V. Vojtova, H. Suchankova, P. Imwensi & M. Kolar (2014). "Antibiotic consumption and its influence on the resistance in Enterobacteriaceae." *BMC Res Notes* **7**, 454.

Sennati, S., G. Santella, J. Di Conza, L. Pallecchi, M. Pino, B. Ghiglione, G. M. Rossolini, M. Radice & G. Gutkind (2012). "Changing epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15." *Antimicrob Agents Chemother* **56**(11), 6003-6005.

Sevillano, E., L. Gallego & J. M. Garcia-Lobo (2009). "First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*." *Pathol Biol (Paris)* **57**(6), 493-495.

Shen, P., Z. Wei, Y. Jiang, X. Du, S. Ji, Y. Yu & L. Li (2009). "Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(10), 4333-4338.

Singh, A., R. V. Goering, S. Simjee, S. L. Foley & M. J. Zervos (2006). "Application of molecular techniques to the study of hospital infection." *Clin Microbiol Rev* **19**(3), 512-530.

Smith, R. & J. Coast (2013). "The true cost of antimicrobial resistance." *BMJ* **346**, f1493.

Snelling, A. M., P. Gerner-Smidt, P. M. Hawkey, J. Heritage, P. Parnell, C. Porter, A. R. Bodenham & T. Inglis (1996). "Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak." *J Clin Microbiol* **34**(5), 1193-1202.

Syrmis, M. W., M. R. O'Carroll, T. P. Sloots, C. Coulter, C. E. Wainwright, S. C. Bell & M. D. Nissen (2004). "Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays." *J Med Microbiol* **53**(Pt 11), 1089-1096.

Tenover, F. C., R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing & B. Swaminathan (1995). "Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." *J Clin Microbiol* **33**(9), 2233-2239.

Toleman, M. A. & T. R. Walsh (2011). "Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria." *FEMS Microbiol Rev* **35**(5), 912-935.

Unkel, S., C. P. Farrington, P. H. Garthwaite, C. Robertson & N. Andrews (2012). "Statistical methods for the prospective detection of infectious disease outbreaks: A review." *Journal of the Royal Statistical Society* **175**, 49-82.

Vanegas, J. M., A. V. Cienfuegos, A. M. Ocampo, L. Lopez, H. del Corral, G. Roncancio, P. Sierra, L. Echeverri-Toro, S. Ospina, N. Maldonado other authors (2014). "Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellin, Colombia." *J Clin Microbiol* **52**(11), 3978-3986.

Vazquez, J. A. & S. Berron (2004). "[Multilocus sequence typing: the molecular marker of the Internet era]." *Enferm Infecc Microbiol Clin* **22**(2), 113-120.

Vílchez, G. & G. Alonso (2009). "Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos." *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* **29**, 6-12.

Villegas, M. V., K. Lolans, A. Correa, J. N. Kattan, J. A. Lopez & J. P. Quinn (2007). "First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(4), 1553-1555.

Wei, Z. Q., X. X. Du, Y. S. Yu, P. Shen, Y. G. Chen & L. J. Li (2007). "Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(2), 763-765.

WHO (2014). "Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. Guidelines for ATC classification and DDD assignment. WHO, Oslo, Norway."

Wolter, D. J., N. D. Hanson & P. D. Lister (2004). "Insertional inactivation of oprD in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance." *FEMS Microbiol Lett* **236**(1), 137-143.

Wolter, D. J., N. Khalaf, I. E. Robledo, G. J. Vazquez, M. I. Sante, E. E. Aquino, R. V. Goering & N. D. Hanson (2009a). "Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(4), 1660-1664.

Wolter, D. J., P. M. Kurpiel, N. Woodford, M. F. Palepou, R. V. Goering & N. D. Hanson (2009b). "Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4." *Antimicrob Agents Chemother* **53**(2), 557-562.

Xavier, D. E., R. C. Picao, R. Girardello, L. C. Fehlberg & A. C. Gales (2010). "Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil." *BMC Microbiol* **10**, 217.

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

Yong, D., M. A. Toleman, J. Bell, B. Ritchie, R. Pratt, H. Ryley & T. R. Walsh (2012). "Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo-beta-lactamase gene, blaAIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia." *Antimicrob Agents Chemother* **56**(12), 6154-6159.

Zarkotou, O., S. Pournaras, E. Voulgari, G. Chrysos, A. Prekates, D. Voutsinas, K. Themeli-Digalaki & A. Tsakris (2010). "Risk factors and outcomes associated with acquisition of colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: a matched case-control study." *J Clin Microbiol* **48**(6), 2271-2274.

Zhao, W. H. & Z. Q. Hu (2010). "Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." *Crit Rev Microbiol* **36**(3), 245-258.