

Caracterización de los plásmidos de resistencia presentes en aislamientos clínicos de Enterobacterias productoras de carbapenemasas

A. Fernandez Lausi¹, C. Quiroga², G. Montenegro¹, A. Di Bella¹, S. Mucci², G. Parmeciano Di Noto², A. Rivolta², A. Tani²

¹ Hospital Profesor Alejandro Posadas, Argentina

² Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica- Facultad de Medicina-UBA, Argentina

RESUMEN

La resistencia a los carbapenemes es un serio problema de alto impacto para la salud pública. En los últimos años se ha evidenciado un preocupante incremento de la resistencia a carbapenemes en aislamientos clínicos de Enterobacterias limitando las opciones terapéuticas contra estos patógenos. Existen varios genes que confieren resistencia a los carbapenemes siendo los más relevantes en esta familia bla_{KPC-2} y bla_{NDM-1} . Estos genes se encuentran asociados a diversos elementos genéticos móviles, tales como secuencias de inserción, transposones y plásmidos. El objetivo de este trabajo fue caracterizar los plásmidos de resistencia presentes en aislamientos clínicos de diversas Enterobacterias productoras de carbapenemasas e identificar el elemento móvil responsable de su diseminación. Se analizaron 19 aislamientos clínicos resistentes a imipenem y meropenem procedentes de un hospital público de la provincia de Buenos Aires, los cuales correspondieron a 10 *Klebsiella pneumoniae*, 5 *Providencia stuartii*, 2 *Proteus mirabilis*, 1 *Enterobacter cloacae* y 1 *Serratia marcescens*. Se determinó la presencia de los genes bla_{KPC-2} y bla_{NDM-1} en estos aislamientos mediante la técnica de PCR, de los cuales 13 resultaron positivos para bla_{KPC-2} , 2 fueron positivos para bla_{NDM-1} y 5 fueron negativos para estos genes. Esto revela la elevada incidencia de bla_{KPC-2} en la resistencia a carbapenemes en las cepas estudiadas. Seguidamente se procedió a tipificar los plásmidos de amplio espectro de diseminación previamente asociados con estos genes de resistencia, tales como IncL/M, IncA/C, IncN e IncFII. Este análisis reveló que el grupo de incompatibilidad más predominante correspondió a IncL/M presente en más de la mitad de las muestras (n=12), seguido por IncN (n=2). No se correspondieron a 6 *K. pneumoniae*, 2 *P. stuartii*, 1 *P. mirabilis* y 1 *E. cloacae*. Por otro lado, 8 de las cepas portadoras de plásmidos IncL/M resultaron ser positivas para KPC-2. Además se observó que las cepas portadoras de plásmidos del grupo IncN correspondían a los dos aislamientos de *P. mirabilis* incluidos en este estudio y que codificaban para la carbapenemasa NDM-1. Nuestro análisis evidencia que existe una elevada prevalencia de los genes bla_{KPC-2} en aislamientos clínicos resistentes a carbapenemes, especialmente en *K. pneumoniae*. La diseminación de estos determinantes de resistencia está asociada a diversos plásmidos conjugativos. Nuestros resultados sugieren que los plásmidos del grupo de incompatibilidad IncL/M podrían ser responsables de la diseminación de la resistencia a carbapenemes; mientras que los genes bla_{NDM-1} estarían codificados en plásmidos del grupo IncN. La identificación de los plásmidos de resistencia presentes en un nicho colabora con la comprensión de la diseminación de la resistencia antibiótica.

INTRODUCCIÓN

La diseminación de la resistencia a carbapenemes en bacteria de la familia *Enterobacteriaceae* es un problema grave para la salud pública. Las Enterobacterias que poseen resistencia a carbapenemes tienen la capacidad de ser resistente a la mayoría de los antibióticos beta-lactámicos así como también a otras familias de antibióticos, tales como aminoglucósidos y quinolonas. Esto los convierte en organismos con multi-resistencia difíciles de erradicar.

Existen dos mecanismos para la resistencia a carbapenemes en Enterobacterias, la reducción de la permeabilidad de la membrana externa combinada con la producción de beta-lactamasas de espectro extendido o por la beta-lactamasa de tipo AmpC; y por la producción de beta-lactamasas capaces de hidrolizar carbapenemes, denominadas carbapenemasas. Los determinantes de resistencia a carbapenemes pertenecen a distintos grupos: las de clase A (KPC, SME, IMI, etc), las metalo-beta-lactamasas o de clase B (IMP, VIM, NDM etc), y las de clase D (tipo OXA-48), las cuales se encuentran ampliamente diseminadas a lo largo del mundo. Las carbapenemasas de clase A puede localizarse en el cromosoma (SME) o ser plasmídicas (KPC).

Las carbapenemasas pueden ser transferidas lateralmente entre bacterias a través de elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones o elementos integrativos. Los plásmidos responsables de la diseminación de los determinantes de resistencias son conocidos como plásmidos de resistencia. Estos plásmidos generalmente son de gran tamaño, en la mayoría de los casos pueden promover su transferencia o ser transferidos y pueden replicarse en una amplia variedad de organismos hospedadores, por lo que también se los identifica como plásmidos BHR.

Los plásmidos se clasifican en grupos de incompatibilidad. En Enterobacterias se han reconocido hasta 27 grupos diferentes. No todas las familias de plásmidos se encuentran con la misma frecuencia en Enterobacterias de relevancia clínica. Entre los grupos más relevantes se encuentran los grupos IncF, IncL1, IncA/C o IncHI2.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar los plásmidos de resistencia presentes en aislamientos clínicos de diversas Enterobacterias productoras de carbapenemasas e identificar el elemento móvil responsable de su diseminación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas utilizadas en este estudio

Se analizaron 19 cepas clínicas provenientes de un hospital público de Buenos Aires en el cual se les determinó los perfiles de susceptibilidad a antibióticos mediante Vitek®.

Las cepas fueron crecidas en medio Luria-Bertani (10g tripton, 10g NaCl, 5g extracto de levadura en 1L de H₂O) a 37°C con agitación, a 200 rpm. Se les extrajo el ADN total a todas las cepas siguiendo el protocolo de Sambrook y col. (1989).

Cepa	Organismo	AMP	SAM	TZP	CEF	CTX	CAZ	FEP	IPM	MEM	AMK	GEN	NAL	CIP	NIT	CST	SXT
CQ30	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	S	R
CQ31	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R
CQ32	<i>P. stuartii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	I	R	R
CQ33	<i>P. stuartii</i>	R	R	I	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R
CQ35	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R
CQ36	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R
CQ37	<i>P. stuartii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
CQ38	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
CQ41	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R
CQ42	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	S	R
CQ50	<i>P. mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R
CQ52	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	I	S	R
CQ53	<i>P. stuartii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R
CQ56	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	S	I	S	R
CQ57	<i>E. cloacae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R
CQ58	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	R
CQ59	<i>S. marcescens</i>	R	R	R	R	I	I	I	R	R	S	S	S	S	S	R	S
CQ61	<i>P. stuartii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R
CQ62	<i>K. pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	S	R

Detección por PCR

Para todas las reacciones de PCR se utilizó 1U de *Taq* ADN polimerasa (Fermentas, ThermoScientific) en buffer 1 x, 2 mM MgCl₂, 0,14 mM de mezcla de dNTP y 0,4 mM de cada *primer* en un volumen final de 50 µL. Las condiciones de amplificación fueron una desnaturalización inicial por 3 min a 95°C, 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a la temperatura de *annealing* adecuada según los *primers*, y 1 min a 72°C, seguido de una extensión final de 5 min a 72°C.

Se buscaron los genes *int1*, bla_{KPC-2} , bla_{NDM-1} , bla_{VIM-2} , bla_{OXA-48} y bla_{SME} . Por otro lado se usaron *primers* para detectar los plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncN, IncA/C, IncFII, IncL/M, IncI, IncFIB e IncW.

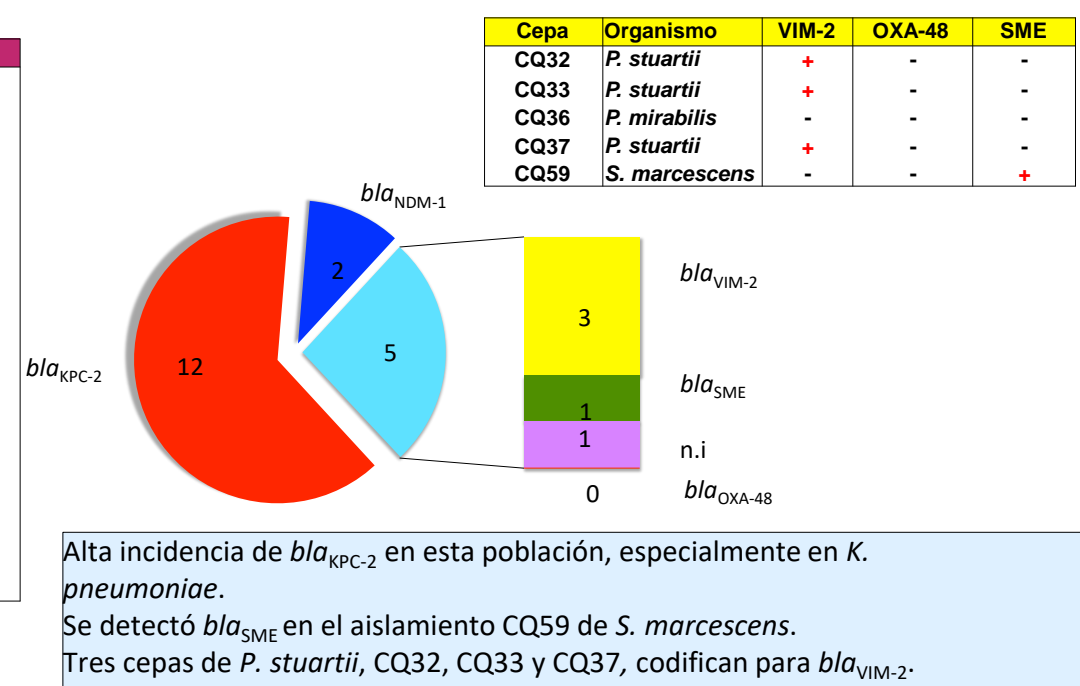
Agradecimientos

CQ es miembro de la Carrera de Investigador Científico del CONICET. Este proyecto fue subvencionado por ANPCyT PICT 2013-1978.



RESULTADOS

Cepa	Organismo	KPC-2	NDM-1
CQ30	<i>K. pneumoniae</i>	+	-
CQ31	<i>K. pneumoniae</i>	+	-
CQ32	<i>P. stuartii</i>	-	-
CQ33	<i>P. stuartii</i>	-	-
CQ35	<i>K. pneumoniae</i>	+	-
CQ36	<i>P. mirabilis</i>	-	-
CQ37	<i>P. stuartii</i>	-	-
CQ38	<i>K. pneumoniae</i>	+	-
CQ41	<i>K. pneumoniae</i>	+	-
CQ42	<i>K. pneumoniae</i>	+	-
CQ50	<i>P. mirabilis</i>	-	+
CQ52	<i>K. pneumoniae</i>	+	-
CQ53	<i>P. stuartii</i>	-	+
CQ56	<i>K. pneumoniae</i>	+	-
CQ57	<i>E. cloacae</i>	+	-
CQ58	<i>K. pneumoniae</i>	+	-
CQ59	<i>S. marcescens</i>	-	-
CQ61	<i>P. stuartii</i>	+	-
CQ62	<i>K. pneumoniae</i>	+	-

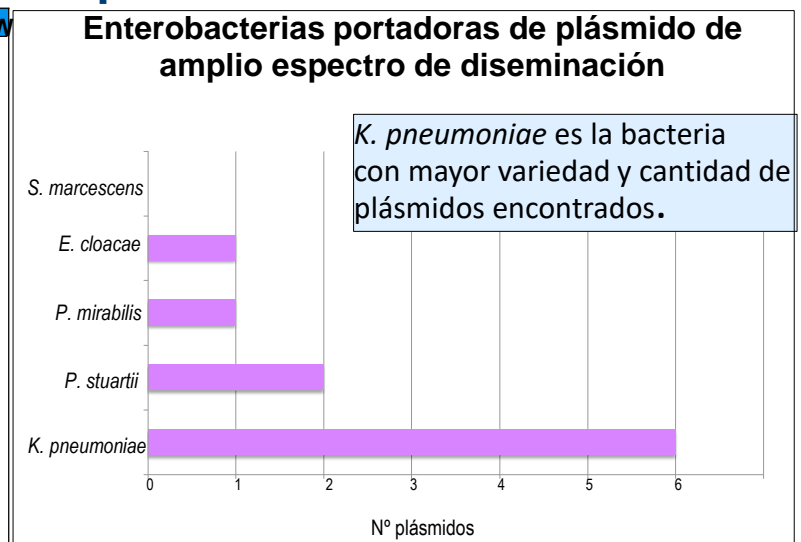


Detección de plásmidos de amplio espectro de diseminación en Enterobacterias resistentes a carbapenemes

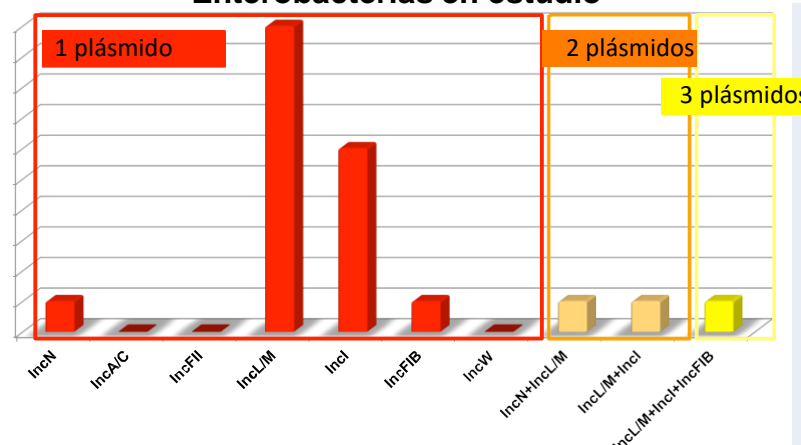
Cepa	Organismo	IncN	IncA/C	IncFII	IncL/M	IncI	IncFIB	IncW
CQ30	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
CQ31	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
CQ32	<i>P. stuartii</i>	-	-	-	-	-	-	-
CQ33	<i>P. stuartii</i>	-	-	-	-	-	-	-
CQ35	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	+	-	-
CQ36	<i>P. mirabilis</i>	+	-	-	+	-	-	-
CQ37	<i>P. stuartii</i>	-	-	-	+	-	-	-
CQ38	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	+	-	-	-
CQ41	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	+	-	-	-
CQ42	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	+	+	+	-
CQ50	<i>P. mirabilis</i>	+	-	-	-	-	-	-
CQ52	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	+	-	-	-
CQ53	<i>P. stuartii</i>	-	-	-	-	-	-	-
CQ56	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	+	-	-	-
CQ57	<i>E. cloacae</i>	-	-	-	+	+	-	-
CQ58	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	+	-	-	-
CQ59	<i>S. marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-
CQ61	<i>P. stuartii</i>	-	-	-	+	-	-	-
CQ62	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	+	-	-	-

IncN se encontró en solo en cepas de *P. mirabilis*.
Se observó una mayor presencia de plásmidos de los grupos IncL/M e IncI en *K. pneumoniae*.
No se detectaron plásmidos en el aislamiento CQ59 de *S. marcescens*.

Se encontraron plásmidos de 4 grupos de incompatibilidad diferentes.
Los plásmidos de mayor prevalencia en esta población fueron los grupos IncL/M e IncI.
Se observó la coexistencia de hasta 3 plásmidos en una misma cepa (*K. pneumoniae* CQ42).

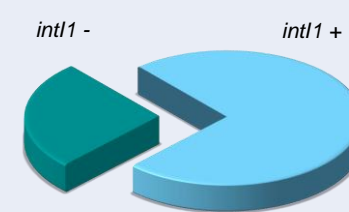


Distribución de plásmidos en la población de Enterobacterias en estudio



Integrones de clase 1 presentes en las cepas en estudio

Cepa	Organismo	<i>int1</i>
CQ30	<i>K. pneumoniae</i>	+
CQ31	<i>K. pneumoniae</i>	+
CQ32	<i>P. stuartii</i>	+
CQ33	<i>P. stuartii</i>	+
CQ35	<i>K. pneumoniae</i>	+
CQ36	<i>P. mirabilis</i>	-
CQ37	<i>P. stuartii</i>	-
CQ38	<i>K. pneumoniae</i>	+
CQ41	<i>K. pneumoniae</i>	+
CQ42	<i>K. pneumoniae</i>	-
CQ50	<i>P. mirabilis</i>	-
CQ52	<i>K. pneumoniae</i>	+
CQ53	<i>P. stuartii</i>	+
CQ56	<i>K. pneumoniae</i>	+
CQ57	<i>E. cloacae</i>	+
CQ58	<i>K. pneumoniae</i>	+
CQ59	<i>S. marcescens</i>	-
CQ61	<i>P. stuartii</i>	+
CQ62	<i>K. pneumoniae</i>	+



Se encontró una alta proporción de integrones de clase 1

Correlación entre los plásmidos BHR, los integrones de clase 1 y el gen bla_{KPC-2}

Cepa	Organismo	bla_{KPC-2}	IncL/M	IncI	<i>int1</i>
CQ30	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	-	+
CQ31	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+	+
CQ32	<i>P. stuartii</i>	-	-	-	-
CQ33	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+	+
CQ35	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	-	+
CQ36	<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	-
CQ37	<i>P. stuartii</i>	-	-	-	-
CQ38	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	-	+
CQ41	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+	+
CQ42	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	+	+
CQ50	<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	-
CQ52	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	-	+
CQ53	<i>P. stuartii</i>	-	-	-	-
CQ56	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	-	+
CQ57	<i>E. cloacae</i>	+	+	+	+
CQ58	<i>K. pneumoniae</i>	+	+	-	+
CQ61	<i>P. stuartii</i>	+	+	-	+
CQ62	<i>K. pneumoniae</i>	+	-	-	+

Los aislamientos de *K. pneumoniae* codificadores de bla_{KPC-2} y portadores integrones de clase 1 poseen en su genoma plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncL/M e IncI.

CONCLUSIONES

- Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* estudiadas poseen una elevada prevalencia de los genes bla_{KPC-2} y baja prevalencia de los genes bla_{NDM-1} , bla_{VIM-2} y bla_{SME} .
- Se detectó bla_{VIM-2} en los aislamientos de *P. stuartii* CQ32, CQ33 y CQ37. La presencia de integrones de clase 1 en estas cepas indican que esta beta-lactamasa estaría localizada en su región variable. No se detectaron plásmidos BHR en estas cepas, lo cual sugiere que se encuentran en otros plásmidos u otras plataformas genómicas.
- La presencia de bla_{SME} indicaría que *S. marcescens* CQ59 posee una isla móvil de tipo SmarG11-1 pero la ausencia de plásmidos en esta cepa limita su diseminación a otros organismos.
- Los plásmidos más diseminados en esta población pertenecen a los grupos de incompatibilidad IncL/M e IncI, los cuales podrían ser responsables de la diseminación de bla_{KPC-2} , especialmente en *K. pneumoniae*.
- Solo las cepas de *P. mirabilis* fueron portadoras de plásmidos del grupo de incompatibilidad IncN.
- No se detectaron plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncA/C, IncFII o IncFIB, típicamente presentes en Enterobacterias.