

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCION</b> .....	4
<b>2. PROBLEMÁTICA ACTUAL</b> .....	6
<b>3. JUSTIFICACION</b> .....	7
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	8
4.1 Objetivo General .....	8
4.2 Objetivos Específicos .....	8
<b>5. MARCO TEORICO</b> .....	9
5.1 Genero <i>Klebsiella</i> .....	9
5.2 Clasificación .....	9
5.3 Factores de Virulencia .....	10
5.4 Antimicrobianos .....	10
5.5 Mecanismos de resistencia .....	12
5.5.1 Modificación enzimática del antibiótico .....	12
5.5.1.1 $\beta$ - lactamasas de espectro extendido (BLEE) .....	12
5.5.2 Bombas de expulsión .....	13
5.5.3 Cambios en la permeabilidad de la membrana externa .....	13
5.5.4 Alteraciones del sitio de acción .....	13
5.6 Importancia biológico de plásmidos .....	14
<b>6. MATERIALES Y METODOS</b> .....	16
6.1 Tipo de estudio .....	16
6.2 Identificación de asilados clínicos .....	16
6.3 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos .....	16
6.4 Extracción de DNA plasmídico .....	17
6.5 Transformación .....	17
6.6 Restricción de plásmidos en células transformadas .....	18
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	19
7.1 Identificación de especies .....	19
7.2 Perfil fenotipo de resistencia .....	19
7.3 Variabilidad genética por perfil plasmídico .....	23
7.4 Demostración de la transmisión de plásmidos que generan resistencia por transformación .....	24
<b>8. CONCLUSIONES</b> .....	30
<b>9. RECOMENDACIONES</b> .....	31
<b>10. REFERENCIAS</b> .....	32

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Mecanismos de acción de agentes antibacterianos .....	11
<b>Tabla 2.</b> Identificación bioquímica de aislados clínicos mediante pruebas estándares. ...	19
<b>Tabla 3.</b> Perfil fenotípico de resistencia de aislados identificados como <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	21
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones mínimas inhibitorias de aislados resistentes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . .....	22
<b>Tabla 5.</b> Número de bandas observadas en el perfil plasmídico para cada cepa resistente de <i>Klebsiella pneumoniae</i> . .....	24

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Porcentaje de Resistencia a antimicrobianos en <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	20
<b>Figura 2.</b> Prueba de sensibilidad por difusión de disco para la cepa No. 12 en agar Mueller Hilton.....	20
<b>Figura 3.</b> Concentración mínima inhibitoria para la cepa No. 12 en medio LB suplementado con las máximas concentraciones de cada antibiótico.....	23
<b>Figura 4.</b> Perfil plasmídico de aislados resistentes a antimicrobianos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	24
<b>Figura 5.</b> Colonias de células transformadas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> con resistencia a cloranfenicol (50µg/mL) en medio Mueller Hilton usando cada una de las bandas purificadas de los aislados resistentes.....	25
<b>Figura 6.</b> Colonias de células transformadas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> con resistencia a cloranfenicol (50µg/mL) en medio Mueller Hilton usando el ADN plasmidico total de los aislados resistentes.....	25
<b>Figura 7.</b> Cultivo positivo de células transformadas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes a cloranfenicol en medio liquido.....	27
<b>Figura 8.</b> Perfil de ADN plasmídico en células transformadas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes a cloranfenicol.....	27
<b>Figura 9.</b> Patrón de restricción de plásmidos que confieren a resistencia a cloranfenicol en células transformadas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	29

## 1. INTRODUCCION

El genero *Klebsiella* es definido como un grupo de bacilos gram negativos, no móviles, usualmente encapsulados de la familia *Enterobacteriaceae*, producen lisina descarboxilasa pero no ornitina descarboxilasa y generalmente son positivos en la prueba de Voges Proskauer.<sup>1</sup> Las especies del genero *Klebsiella* son ubicuas en la naturaleza y comúnmente se encuentra en dos hábitats: uno es el medio ambiente donde se observa en la superficie del agua, aguas residuales, suelo y plantas, el otro es la superficie de las mucosas de mamíferos tales como humanos, caballos y cerdos;<sup>1-5</sup> Sin embargo los aislados medioambientales se han descrito indistinguibles de los clínicos con respecto a sus reacciones bioquímicas y virulencia.<sup>6</sup> Debido a que uno de los hábitats de las especies del genero *Klebsiella* son las mucosas humanas, su relación con brotes y enfermedades infecciosas es frecuente, <sup>7-12</sup> para Colombia, se reconoce a *Klebsiella pneumoniae* como el cuarto patógeno causante de infección y cada vez es más alta la presencia de cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación.<sup>13</sup>

Los elementos móviles juegan un papel importante dentro de las bacterias de este género, ya que pueden ser intercambiados promiscuamente entre un amplio espectro de bacterias y contribuye a la plasticidad del genoma bacterial. Como componentes del pool de genes horizontales, los elementos genéticos móviles incluyen secuencias de inserción, transposones, integrones, bacteriófagos, islotes genéticos (tales como islotes patogénicos), plásmidos y la combinación de estos elementos. Los plásmidos están presentes en todos los linajes de las bacterias y han sido encontrados en todas las comunidades bacterianas, incluyendo las del suelo, marinas y ambientes clínicos.<sup>14</sup> En la actualidad la información acerca de las secuencias plasmídicas es limitada.<sup>15</sup> Los análisis comparativos revelan la complejidad de la genética plasmídica y la capacidad de estos elementos para replicarse autónomamente en células bacterianas permisivas (receptoras de ADN plasmídico), además de la presencia de grupos de genes únicos claramente diferentes de los genes que normalmente se encuentran en los cromosomas bacterianos.

En las últimas décadas se han desarrollado antimicrobianos que tienen diferentes sitios de acción dentro del microorganismo como son: interferencia de la síntesis de la pared celular, inhibición de la síntesis de proteínas, interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos e inhibición de alguna vía metabólica importante.<sup>16</sup> Debido a esto las especies del genero *Klebsiella* han desarrollado mecanismos de resistencia para contrarrestar el

efecto de los antimicrobianos y sus vías de resistencia están en constante evolución.<sup>17</sup> Se han reportado varios mecanismos de resistencia, entre ellos el paso de genes de resistencia vía plasmídica. La presencia de cepas resistentes en humanos es un inconveniente para el control y el tratamiento de las infecciones siendo así un serio problema de salud pública,<sup>18</sup> por lo que este trabajo se basó en estudiar la resistencia por transferencia horizontal de plásmidos tratando de entender mejor la biología de *Klebsiella pneumoniae* y sus implicaciones en la resistencia a antimicrobianos para cepas aisladas clínicamente en la ciudad de Armenia.

## 2. PROBLEMÁTICA ACTUAL

Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* constituyen una porción significativa dentro de los microorganismos gram negativos que causan infecciones serias en humanos y animales. Estos microorganismos pueden presentarse endogenamente como parte de la flora natural del hospedero, o pueden ser adquiridos exogenamente. El incremento de la prevalencia de aislados resistentes ha aumentado drásticamente y se evidencia que la resistencia y la virulencia entre cepas clínicas pueden transferirse fácilmente vía plásmido.<sup>19</sup> Algunos aislados multirresistentes producen enzimas que generan resistencia mediadas por plásmidos las cuales son capaces de hidrolizar B- lactámicos, además de producir BLEE (betalactamasas de espectro extendido) los tipos plasmídico TEM (betalactamasa Temoneira) y SHV (betalactamasa sulfhidril variable) también han sido implicados en casos de infecciones con cepas resistentes.<sup>11</sup> En Colombia la prevalencia de resistencia de acuerdo con lo informado por Villegas *et.al* se encuentra por encima del 40%. Adicionalmente, estudios realizados en la Costa atlántica Colombiana han mostrado prevalencias del 37% en *Enterobacteriaceae* y del 47.6% en los no fermentadores; en otros estudios se reporta para la zona andina una prevalencia del 30% para *Klebsiella pneumoniae*.<sup>18</sup> Actualmente no se reportan estudios acerca de las subpoblaciones de *Klebsiella pneumoniae* en la ciudad de Armenia por lo que no se conoce en detalle los perfiles fenotípicos ni moleculares entre cepas de esta especie.

### 3. JUSTIFICACION

*K. pneumoniae* ha sido identificada como la principal especie reservorio de plásmidos R (resistencia) con capacidad de transferirse no solo intraespecífica sino también interespecíficamente, lo que asigna gran importancia a la determinación de los perfiles plasmidiales como metodología de uso para estudiar la variabilidad genética dentro de las especies del género y la caracterización de sus poblaciones.<sup>8</sup> Las metodologías moleculares han colaborado desde hace algunos años con el conocimiento de la variabilidad genética de algunos géneros sin embargo es conveniente combinar la información genética plasmídica con el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de cada aislamiento. El conocimiento de las características poblacionales aporta valiosa información que ayuda a identificar problemáticas a causa de alguna población en particular, a plantear estrategias de investigación tanto en el área biológica como médica y a determinar la existencia de uno o varios factores genéticos que podrían favorecer la diseminación de las variantes circulantes.<sup>7</sup>

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Caracterizar fenotípicamente y por perfil plasmídico cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antimicrobianos.

### 4.2 Objetivos específicos

- Identificar fenotípicamente aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* por pruebas bioquímicas.
- Determinar el perfil fenotípico de antibiótico resistencia de los aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*.
- Caracterizar por perfil plasmídico las cepas de *Klebsiella pneumoniae* antibioticoresistentes.
- Correlacionar el perfil plasmídico y las características fenotípicas de resistencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae*.



## 5. MARCO TEORICO

### 5.1 Genero *Klebsiella*

El genero *Klebsiella* fue llamado así en honor de Edwin Klebs, un microbiólogo alemán de fines del siglo XIX. Los bacilos ahora conocidos como *Klebsiella* también fueron descritos por Carl Friedlander, y por muchos años el bacilo de Friedlander fue también conocido como causa de neumonías severas y en ocasiones fatales.<sup>20</sup>

*K. pneumoniae* es la especie tipo de este genero. Debe sospecharse la presencia de especies de *Klebsiella* cuando se recuperan colonias grandes de consistencia mucosa en placas de aislamiento primario como es el agar nutritivo. Sobre agar MacConkey, típicamente aparecen como colonias grandes, mucoides y rojas, con pigmento rojo usualmente difusible en el agar circundante, lo que indica fermentación de la lactosa, sin embargo no todas las cepas son mucosas y ciertas especies de *Enterobacter* pueden ser muy similares a especies de *Klebsiella* en las pruebas de identificación. Todas las especies de *Klebsiella* son inmóviles y la mayoría no descarboxilan la ornitina, (*K. ornithinolytica* es ornitina positiva) características que son positivas para la mayoría de especies de *Enterobacter*.<sup>20</sup>

Muchas cepas de *Klebsiella* hidrolizan la urea lentamente, y producen un color rosado pálido en la superficie inclinada del agar urea de Christensen. La producción de indol a partir del triptofano puede usarse para separar dos especies principales *K. pneumoniae* es indol negativa, *K. oxytoca* es indol positiva. En algunos casos las cepas no producen estas reacciones clásicas, lo cual conduce al nombramiento de varias especies o subespecies adicionales,<sup>20</sup> como es el caso de las subespecies dentro de *Klebsiella pneumoniae*.

### 5.2 Clasificación

Actualmente el genero *Klebsiella* es subdividido en cinco especies de las cuales son clínicamente importantes *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* la cual a su vez comprende tres subespecies, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. Esta clasificación fue basada en taxonomía numérica usando caracteres tanto bioquímicos como fenotípicos y datos derivados de estudios de hibridación de ADN – ADN,<sup>21</sup> mientras que *K. ornithinolytica*, *K. terrigena* y *K.*

*planticola* son raramente aisladas de muestras clinicos humanos. *K. planticola* y *K. terrigena* son consideradas especies ambientales. Una característica importante del género es que ninguna de las especies crecen a temperaturas elevadas, tales como 44.5° C, <sup>5</sup> así el género *Klebsiella* comprende un grupo de bacilos gran negativos, no formadores de esporas y no móviles.<sup>22</sup>

### 5.3 Factores De Virulencia

Todos los miembros de *Enterobacteriaceae* son capaces de elaborar una capa de polisacáridos asociado a la superficie llamada capsula. La composición de estos polisacáridos capsulares es dependiente de la cepa.<sup>23</sup> La capsula es considerada como la propiedad de virulencia dominante, <sup>24</sup> por lo tanto esta capsula de polisacáridos contribuye a la patogénesis por la resistencia mediada a la fagocitosis y a la muerte por suero.<sup>25, 26</sup> Algunas funciones adicionales incluyen protección contra desecación y ataque de fagos; Además esta propiedad ha sido fuertemente asociada con infecciones extraintestinales, tales como septicemia, meningitis entre otras.<sup>27, 28</sup>

*K. pneumoniae* produce un número de factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis, incluyendo adhesinas fimbriales, sideroforos, antígenos O, y antígenos capsulares. En *K. pneumoniae*, como mínimo 77 polisacáridos distintos llamados antígenos K han sido reportados.<sup>28</sup>

### 5.4 Antimicrobianos

La mayoría de agentes antimicrobianos usados para el tratamiento de infecciones bacterianas pueden ser categorizados de acuerdo a sus principales mecanismos de acción. Estos son los modos de acción más comunes: interferencia de la síntesis de la pared celular, inhibición de la síntesis de proteínas, interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos e inhibición de alguna vía metabólica importante (Tabla 1). Los medicamentos antibacterianos que actúan en la inhibición de la síntesis de la pared celular incluyen: los lactámicos tales como la penicilina, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos y los glicopéptidos, incluyendo vancomicina y teicoplanina.<sup>29</sup>

**Tabla 1.** Mecanismos de acción de agentes antibacterianos

<p><b>Antibióticos que interfieren con la síntesis de la pared celular</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes, monobactámicos</li><li>• Glicopéptidos: vancomicina, teicoplanina</li></ul> <p><b>Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Unión a la subunidad ribosomal 50S : macrólidos, cloranfenicol, clindamicina.</li><li>• Unión a la subunidad ribosomal 30S: aminoglicósidos, tetraciclinas</li><li>• Unión a la isoleucina -tRNA sintetasa bacteriana: mupirocina</li></ul> <p><b>Interferencia con la síntesis de ácidos nucleicos</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Inhibición de la síntesis de ADN: fluoroquinolonas</li><li>• Inhibición de la síntesis de ARN: rifampicina</li></ul> <p><b>Inhibición de vía metabólica</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Sulfonamidas, analogos al ácido fólico</li></ul> <p><b>Daño de la estructura membranal bacteriana</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Polimixinas, daptomicina</li></ul>
--

Los agentes láctamicos inhiben la síntesis de la pared celular por interferencia de las enzimas requeridas para la síntesis de la capa de peptidoglicano. La vancomicina y la teicoplanina también interfieren con la síntesis de la pared celular, pero en este caso, por interferencia de la unión de residuos de D-alanina terminales de la cadena del peptidoglicano naciente, por lo tanto inhibe la síntesis estable de la pared celular. Los macrólidos, aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, estreptogramicinas y oxazolidinonas actúan inhibiendo la síntesis de proteínas. Los ribosomas bacterianos difieren en estructura de las subunidades en células eucariotas. Los agentes antibacterianos toman ventajas de estas diferencias para inhibir selectivamente el crecimiento bacteriano. Los macrólidos, aminoglicósidos y tetraciclinas se unen a la subunidad 30S de los ribosomas mientras que el cloranfenicol se une a la subunidad 50S. Las fluoroquinolonas dirigen sus efectos antibacteriales a la intervención de la síntesis de ADN y causan la ruptura letal de la doble hebra de ADN durante la replicación. Mientras las sulfonamidas y el trimetoprim bloquean la vía de la síntesis del ácido fólico, y por último inhibe la síntesis de ADN.<sup>16</sup>

La perturbación de la estructura de la membrana bacteriana puede ser un quinto punto de acción de los antimicrobianos, aunque no es un mecanismo bien caracterizado, se dice que polimixinas ejercen sus efectos inhibitorios mediante el aumento de la permeabilidad de las membranas bacterianas, causando la liberación de todo el contenido bacterial. La daptomicina es un lipopeptido cíclico que aparentemente introduce su cola de lípidos en la membrana de la célula bacteriana causándole una despolarización y la eventual muerte.<sup>16</sup>

## **5.5 Mecanismos de resistencia**

Teniendo en cuenta que las bacterias gram negativas tienen un arsenal de mecanismos de resistencia a su disposición y que la selección de estos mecanismos puede llevar a falla terapéutica, es importante conocer los sus mecanismos de resistencia más relevantes. Estos mecanismos de resistencia podrían resumirse en cuatro categorías:

**5.5.1 Modificación enzimática del antibiótico:** Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos tienen en común su estructura molecular con un anillo  $\beta$ -lactámico, el cual es responsable en gran parte de su acción antimicrobiana. Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas capaces de romper este anillo e inactivar estos antibióticos. Las  $\beta$ -lactamasas son ubicuas de las bacterias gram negativas y representan una forma importante de resistencia. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias, lo que representa un gran reto para el control de las infecciones.<sup>30</sup>

**5.5.1.1  $\beta$ - lactamasas de espectro extendido (BLEE):** Las BLEE han sido reportadas en múltiples especies de bacterias Gram negativas. Las especies de *Klebsiella* Y *Escherichia coli* son las más frecuentemente implicadas. Estas enzimas confieren resistencia a las oximinocefalosporinas (como las cefalosporinas de tercera generación), el aztreonam, las penicilinas y las cefalosporinas de espectro reducido. Por otro lado, son incapaces de hidrolizar cefamicinas (cefotetán y cefotetán) y carbapenemes. Las BLEE son inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico, el sulbactam y el tazobactam. Se han descrito varias familias de BLEE, siendo TEM, SHV y CTX-M las más prevalentes y OXA, PER VER, BES Y TOHO las menos frecuentes. La mayoría de BLEE se ha originado por medio de mutaciones espontáneas de  $\beta$ -lactamasas de espectro reducido por cambios en los aminoácidos en su sitio activo, lo que permite ampliar su capacidad hidrolítica.

Una característica importante de las BLEE es que son mediadas por plásmidos, lo cual les confiere una increíble capacidad de diseminación entre diferentes especies. Además, en el mismo plásmido que porta los genes de BLEE, pueden encontrarse genes que codifican resistencia para aminoglucósidos, tetraciclinas y trimetoprim/sulfametoxazol, lo cual puede contribuir a la resistencia de múltiples antibióticos.<sup>30</sup>

**5.5.2 Bombas de expulsión:** Las bombas de expulsión han sido reconocidas por muchos años y están presentes en cada célula. Su popularidad ha venido en aumento concomitantemente con la creciente evidencia que las implica como responsables de resistencia contra antimicrobianos, no sólo en bacterias, sino también en otros patógenos como los parásitos del género *Plasmodium*, se encuentran en la membrana externa de la célula y expulsan hacia el exterior de gran cantidad de moléculas, entre ellas, metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antibióticos; para ello, utilizan la hidrólisis de ATP o un mecanismo de contra-transporte iónico como sustrato energético. El principal papel de este mecanismo es mantener bajas las concentraciones de sustancias tóxicas dentro de la célula. Las bombas de salida pueden ser específicas para un fármaco (generalmente, codificadas en plásmido y, por lo tanto, transmisibles) o inespecíficas (generalmente expresadas en el cromosoma bacteriano).<sup>30</sup>

**5.5.3 Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** Las porinas embebidas en la membrana externa de las bacterias gram negativas son canales que trabajan como filtros en una membrana permeable. Además de otras funciones vitales, estas moléculas tienen la capacidad de retardar el acceso de los antibióticos al interior de la bacteria. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos deben penetrar a través de estos canales; cuando se pierde una porina por mutaciones, aumentan las CIM (concentración inhibitoria mínima) para el antibiótico. Las porinas pueden ser específicas o inespecíficas dependiendo de su selectividad para las moléculas que dejan pasar.<sup>30</sup>

**5.5.4 Alteraciones del sitio de acción:** El cambio en la estructura terciaria del sitio donde los antibióticos ejercen su acción es el otro mecanismo de resistencia. Los sitios de acción se pueden encontrar en diferentes componentes bacterianos que involucran actividades celulares vitales. En el caso de la síntesis de la pared celular, las proteínas unidoras de penicilinas son las responsables de la transpeptidación, proceso fundamental para la estabilidad de la pared celular. Todos los  $\beta$ -lactámicos tienen como blanco las proteínas unidoras de penicilinas, que llevan a la lisis de la pared celular. Las alteraciones

estructurales secundarias y mutaciones pueden disminuir la afinidad de los  $\beta$ -lactámicos por las proteínas unidoras de penicilinas y permiten que la bacteria continúe con su pared indemne y sobreviva. Este mecanismo es el más importante para las bacterias gram positivas, especialmente, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Para las bacterias gram negativas esta estrategia es menos frecuente. Otro sitio de acción de los antibióticos es la síntesis de proteínas. Este proceso puede inhibirse al atacar los componentes nucleares de la transcripción del ARN. Por ejemplo, las quinolonas inhiben la topoisomerasa, enzima encargada del desdoblamiento del ADN para su replicación. Asimismo, la síntesis de proteínas, llevada a cabo en los ribosomas, puede ser inhibida por fármacos como los aminoglucósidos, las tetraciclinas, la clindamicina, los macrólidos y el cloranfenicol. Usualmente se debe a alteraciones cromosómicas aunque recientemente se ha asociado a genes transmitidos por plásmidos. En Colombia existen tasas de resistencia a ciprofloxacina en *E. coli* de alrededor de 50%, lo cual se encuentra muy por encima de lo reportado en los Estados Unidos; los mecanismos causantes aún no se han elucidado.<sup>30</sup>

## 5.6 Importancia biológica de plásmidos

Los plásmidos son elementos genéticos móviles, circulares y autoreplicativos que pueden ser intercambiados promiscuamente entre un amplio espectro de bacterias, contribuyendo así a la diversidad genética de estos microorganismos. Este tipo de material genético desempeña un papel muy importante dentro de muchas comunidades bacterianas incluyendo las especies del género *Klebsiella*. Estos permiten a las bacterias expresar grupos de genes que han adquirido por transmisión horizontal principalmente por conjugación, muchos de estos genes adquiridos resultan ventajosos para la adaptación y la supervivencia frente a ambientes de presión selectiva. Para que el proceso de conjugación se lleve a cabo es necesario que los microorganismos se aproximen, lo que a su vez permite la formación de películas o *biofilms* produciendo una barrera física de protección contra depredadores. Los plásmidos también proveen variación genética, actúan como fuentes de recombinación y debido a su largo tiempo de retención en la célula se puede observar una rápida fijación de sus genes en el cromosoma, lo que lleva a una mayor probabilidad que las características emergentes persistan.<sup>14</sup>

En las especies del género *Klebsiella* el desarrollo de resistencia a antibióticos y la capacidad de utilizar nuevas fuentes de carbono; son ejemplos de la plasticidad y de la

complejidad genética que pueden encontrarse como producto de la presencia de plásmidos particulares. A menudo las poblaciones de *Klebsiella* resultan ser resistentes a antibióticos; En Colombia, se reconoce a *Klebsiella pneumoniae* como el cuarto patógeno causante de infección, y cada vez es más frecuente la presencia de cepas resistentes a cefalosporinas de tercera generación,<sup>13</sup> además se han secuenciado diferentes plásmidos de resistencia; a continuación se nombran algunos de los plásmidos reportados los cuales albergan genes tanto de resistencia como de virulencia para las especies de este género: plásmido con gen CTX-M-15 beta lactamasa involucrada en brotes nosocomiales con un tamaño de 92 Kilobases,<sup>31</sup> plásmido en *Klebsiella oxytoca* que codifica una lactamasa tipo bCMY,<sup>32,33</sup> plásmido pJHCMW1 que confiere multiresistencia a amikacina, kanamicina, tobramicina, y ampicilina en *Klebsiella pneumoniae*,<sup>34-36</sup> plásmido que codifica para Aerobactina, el cual se correlaciona con la virulencia,<sup>37, 38</sup> plásmido pMG252 de resistencia a la quinolona,<sup>39, 40</sup> plásmido de 150Kb que codifica para *blaACT* y confiere resistencia a carbapemenes,<sup>41</sup> plásmido que media la producción de  $\beta$ -lactamasas,<sup>42</sup> de  $\beta$ -lactamasas Am130C<sup>43-45</sup> y plásmidos promotores de muerte entre otros.<sup>46</sup>

## 6. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Tipo de estudio

Este trabajo es un estudio descriptivo y analítico de la relación entre el perfil fenotípico y molecular de la resistencia a diferentes antibióticos de los aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* en la ciudad de Armenia. En este trabajo se estudiaron 37 aislados clínicos de bacilos gram negativos, de los cuales 25 eran *Klebsiella pneumoniae*. Estos aislados fueron obtenidos de individuos tanto de hospitalización como de consulta externa de la Clínica Central del Quindío entre enero y noviembre del 2007; los aislamientos se realizaron a partir de muestras tomadas de: tracto respiratorio, heridas quirúrgicas, esputo y muestras orotraqueales, mientras que la información de los individuos infectados no estuvo disponible para ser incluida en este trabajo. Las bacterias fueron criopreservadas en glicerol a -80 °C y posteriormente recuperadas en medio LB. Una vez obtenido el crecimiento en medio líquido se empleo un inóculo para realizar la identificación bioquímica, el perfil fenotípico y el perfil plasmídico. Como control negativo del perfil fenotípico y molecular se uso la cepa de referencia *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 suministrada por el grupo de investigación en microbiología de la Universidad Nacional de Colombia.

### 6.2 Identificación de aislados clínicos

La identificación se realizó bioquímicamente siguiendo los protocolos estándares para las pruebas de Indol, Citrato Simmons, Voges Proskauer, Triple Azúcar Hierro, Urea, Movilidad, H<sub>2</sub>S, Gas y Rojo de Metilo.<sup>2, 47</sup>

### 6.3 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Para llevar a cabo las pruebas de sensibilidad se uso la técnica de difusión en disco con los siguientes antibióticos: Amikacina (AK), Cefazolina (CZ), Cefalotina (CF), Gentamicina (GN), Cefuroxima (CXM), Amoxicilina ácido clavulánico (AMC), Cefotaxima (CTX), Imipenem (IMI), Ciprofloxacina (CIP), Ceftazidima (CAZ), Aztreonam (ATM), Cloranfenicol (C) (Oxoid®), en medio de cultivo estándar Mueller Hilton.<sup>47</sup> El inóculo se preparo a una concentración de  $150 \times 10^6$ /ml según la escala de Mcfarland Estandar (Biomérieux) y se tomaron 500 µl para realizar la siembra por extendido masivo sobre las cajas de agar.



Esta técnica se empleo en 25 aislados que fueron identificados como *Klebsiella pneumoniae*.

Para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias se uso la técnica de macrodilución en caldo, los antibióticos usados en esta prueba fueron los mismos que en los antibiogramas pero en estado liofilizado los cuales fueron de calidad molecular (SIGMA). Se uso el medio de cultivo Luria base y el inóculo fue de 500µl de bacterias a una turbidez de  $150 \times 10^6$ /ml en la escala Mcfarland por cada 5 ml de medio de cultivo enriquecido con las diferentes concentraciones de cada uno de los antibióticos. Esta técnica se empleo para 9 aislados de *Klebsiella pneumoniae* que presentaron resistencia a al menos un antibiótico en la prueba de difusión de disco.

Estas dos técnicas fueron desarrolladas de acuerdo con las recomendaciones del Comité Nacional de Procedimientos de Laboratorios Clínicos (*Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS),<sup>48</sup> así como la interpretación de los resultados.

#### **6.4 Extracción de DNA plasmídico**

9 cepas resistentes de *Klebsiella* fueron cultivadas en medio líquido LB e incubadas a 37°C por 18 horas. La extracción y purificación de plásmidos se realizo usando el kit *Wizard Plus SV minipreps DNA purification System* marca Promega. Los plásmidos extraídos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y un voltaje de 100V por 4 horas. El patrón electroforético fue observado bajo un transluminador de luz ultravioleta y el peso molecular de los plásmidos se determino con los marcadores de alto peso molecular: Easy Ladder II (500- 5.000 pb marca Biotin) y  $\lambda$  *HindIII* DNA Ladder (564- 23.130 pb). Las bandas de ADN plasmídico fueron cortadas del gel y purificadas con el Kit de purificación *Wizard SV gel and PCR Clean – Up System* marca promega y preservadas a -20 °C.

#### **6.5 Transformación**

Para la transformación se siguió el protocolo de preparación y transformación de células de *E. coli* competentes usando Cloruro de Calcio,<sup>49</sup> empleando las cepas de referencia *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 y *E. coli* DH5 $\alpha$  como receptoras del ADN plasmídico purificado a partir de los aislados; se llevaron a cabo dos ensayos de transformación: uno

usando cada banda purificada de ADN plasmídico y otro con el ADN total plasmídico de cada cepa , posteriormente se sembró un inóculo de 50µL de células transformadas en medio Mueller Hilton con cada uno de los antibióticos evaluados a una concentración de 50µg/mL, con el fin de evaluar la relación entre la resistencia en el perfil fenotípico y la presencia de uno o varios plásmidos. Las células transformadas se sembraron nuevamente en Luria base enriquecido con antibiótico a 50µg/mL para corroborar la resistencia adquirida después de la transformación. Se realizó una segunda extracción de ADN plasmídico después del proceso de transformación, la cual se hizo bajo las mismas condiciones que la primera tanto en extracción como en las condiciones electroforéticas.

### **6.6 Restricción de plásmidos en células transformadas**

Para la restricción de los plásmidos en células transformadas se usaron las siguientes enzimas: *Ban II*, *EcoRI*, *Sal I*, *Pvu II*, *Taq I*, *Xho I* y *Pst I*, ya que según los reportes son las más usadas para la restricción de plásmidos en *Klebsiella pneumoniae*, el tiempo y temperatura de incubación fueron las óptimas para cada enzima. El producto de la reacción de restricción fue observado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% corrido a 70 voltios durante 3 horas. El peso molecular de los fragmentos de ADN plasmídico se determinó con el marcador de peso molecular *HyperLadder II* (50- 2000 pb, marca Bioline).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSION

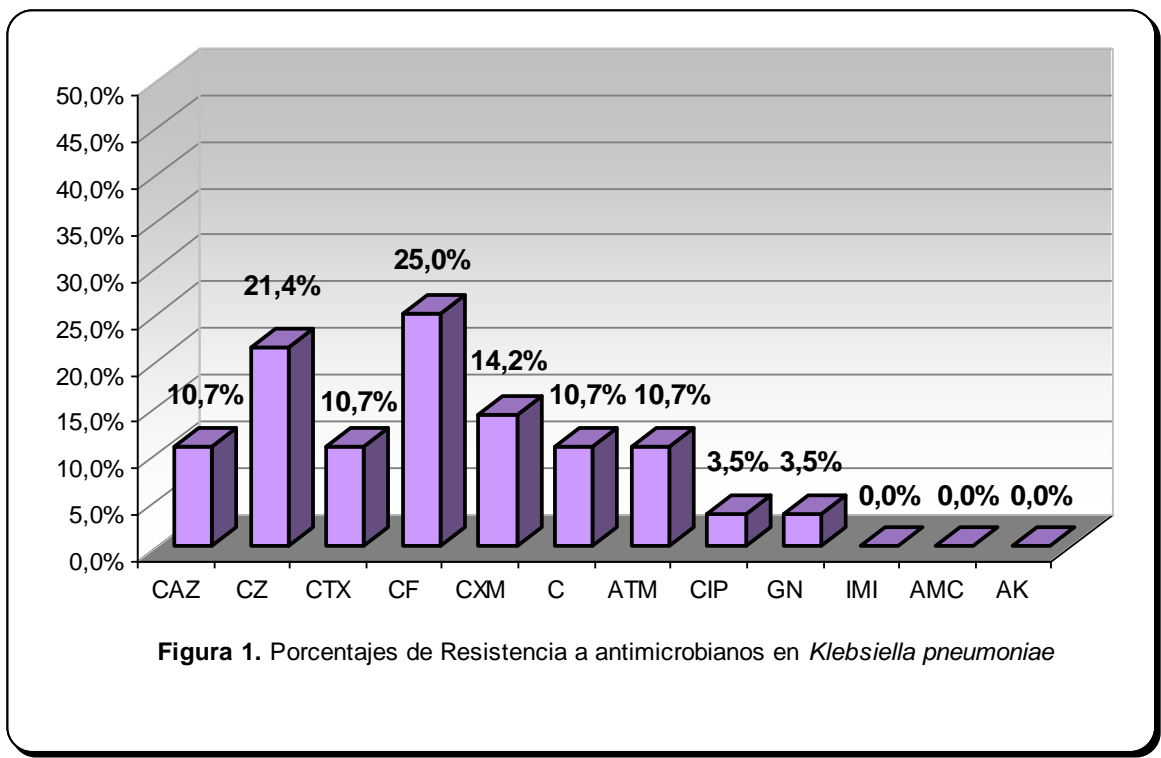
**7.1 Identificación de especies:** De los 37 aislados clínicos evaluados, 25 fueron identificados como *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 2, barras grises); Sin embargo se observaron diferencias en las reacciones bioquímicas dentro de la misma especie, esto es debido a que *Klebsiella pneumoniae* comprende tres subespecies que son *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *K. pneumoniae* subsp. *Rhinoscleromatis*.<sup>21</sup> También se identificaron tres especies de *Klebsiella oxytoca* (tabla 2, barras púrpuras), las 9 cepas que aparecen en color rosa, fueron eliminadas del estudio ya que presentaron reacciones bioquímicas características de otros géneros dentro de la familia *Enterobacteriaceae* como es el genero *Enterobacter*.

**Tabla 2.** Identificación bioquímica de aislados clínicos mediante pruebas estándares.

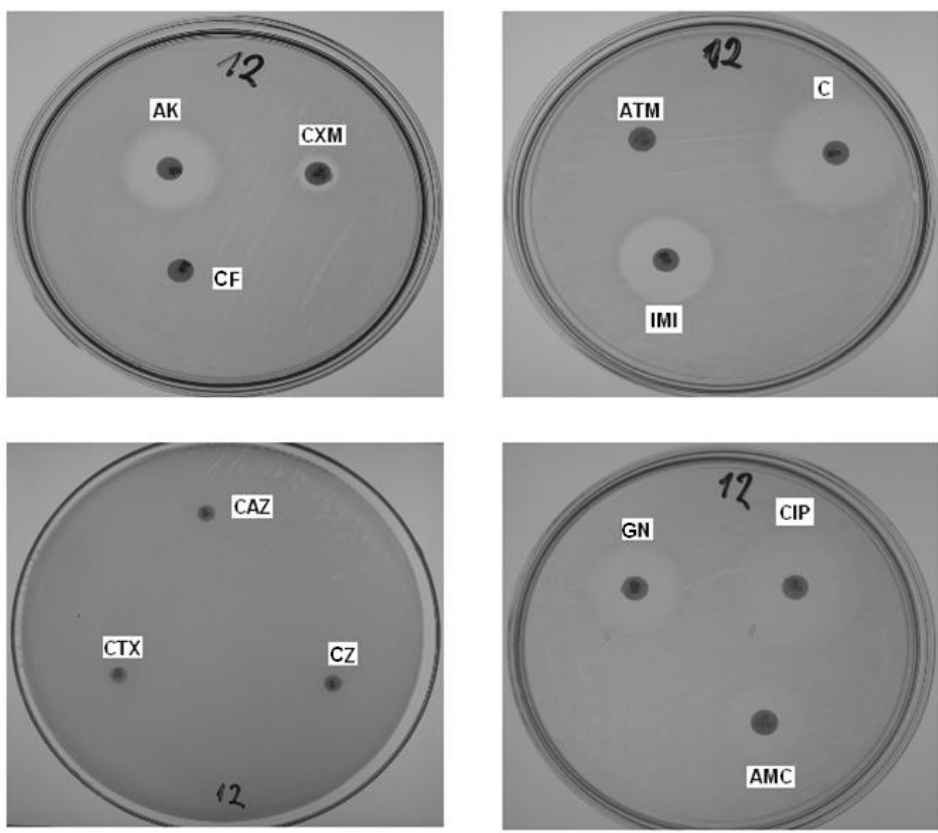
**MOTILIDAD:** movilidad; **CITRATO:** asimilación de citratos, **UREA:** asimilación de urea; **VP:** prueba de voges proskauer; **RM:** prueba de rojo metilo; **INDOL:** prueba de indol; **TSI:** triple azúcar hierro; **GAS:** producción de dióxido de carbono. **H2S:** producción de ácido sulfhídrico.

	CEPA																																						
PRUEBA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
MOTILIDAD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CITRATO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UREA	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RM	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INDOL	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GAS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

**7.2 Perfil fenotípico de resistencia:** En la prueba de difusión en disco se encontraron 9 cepas con resistencia a diferentes antibióticos: la cepa 4 con monoresistencia a CAZ, la cepa 6 con resistencia a CZ, CF, y C; la cepa 8 a CF, y C; la cepa 9 a CZ, CF, CIP, GN. Para La cepa 12 a CAZ, CZ CTX, CF, CXM, y ATM (Figura 2) La cepa numero 18 presento una resistencia intermedia a CZ y CF; la cepa 22 con resistencia solo a C; la cepa 23 con resistencia a CZ, CTZ, CF, CXM y ATM por ultimo la cepa 28 con resistencia a CAZ, CZ, CTX, CF, CXM (Tabla 3). El porcentaje de resistencia frente a cada uno de los antibióticos evaluados fue el siguiente: CAZ (3/28. 10,7%), CZ (6/28. 21,4%), CTX (3/28. 10,7%), CF (7/28. 25%), CXM (4/28.14,2%), C (3/28. 10,7%), ATM (3 /28. 10,7%), CIP (1 /28. 3,5%), GN (1 /28. 3,5%), mientras que la sensibilidad a IML, AMC y AK fue de un 100% en todas las cepas (Figura 1).



**Figura 1.** Porcentaje de Resistencia a antimicrobianos en *Klebsiella pneumoniae*.



**Figura 2.** Prueba de sensibilidad por difusión de disco para la cepa N° 12 en agar Mueller Hilton.

**Tabla 3.** Perfil fenotípico de resistencia de aislados identificados como *Klebsiella pneumoniae*

CEPA	ANTIBIOTICO											
	CAZ	CZ	CTX	AK	CF	CXM	C	IMI	ATM	CIP	GN	AMC
1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S
7	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	S	S	S	S	R	I	R	S	S	S	S	S
9	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S
13	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
14	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
15	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
21	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
23	S	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S
24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
25	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
27	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
28	R	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S
30	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
REF	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

**S:** Sensible, **R:** Resistente; **I:** intermedia, **CAZ:** ceftazidima, **CZ:** cefazolina, **CTX:** cefotaxima, **AK:** amikacina, **CF:** cefalotina, **CXM:** cefuroxima, **C:** cloranfenicol, **IMI:** imipenem, **ATM:** aztreonam, **CIP:** ciprofloxacina, **GN:** gentamicina, **AMC:** amoxicilina acido clavulánico, **REF:** cepa de referencia ATCC 13883 como control negativo, **Región sombreada:** aislamientos que presentaron resistencia.

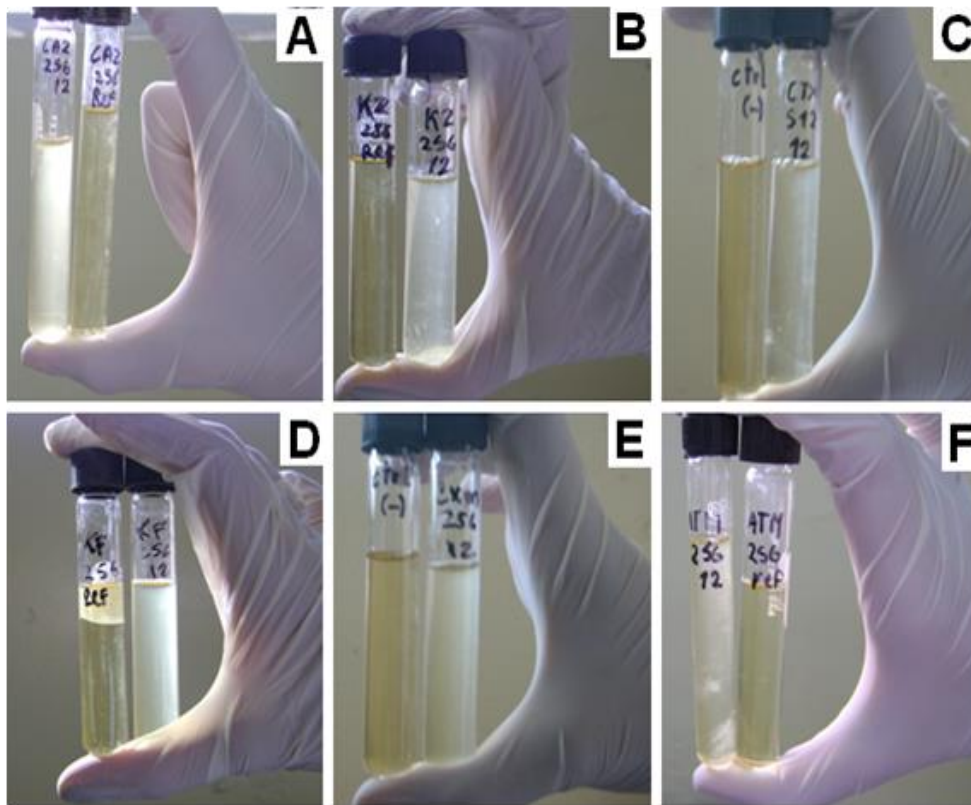
Estos resultados mostraron que la mayor tasa de resistencia se presentó frente a dos cefalosporinas de primera generación (CF y CZ 25% y 21,4% respectivamente), este porcentaje de resistencia es más alto que el reportado para otras ciudades de Colombia, como es el caso de Bogotá, Barranquilla, Bucaramanga, Medellín, Cali y Pereira donde los porcentajes de resistencia varían entre 21 y 17% para esta clase de antibióticos,<sup>50</sup> mientras que para la ciudad de Montería se registra la mayor tasa de resistencia con un porcentaje de 46%.<sup>51</sup> Las cepas de la ciudad de Villavicencio son las que presentan menores porcentajes de resistencia con un 9,52%.<sup>52</sup>

La concentración mínima inhibitoria observada muestra que las cepas 9, 12, 18, 22, 23 y 28 tienen una resistencia absoluta a la concentración de cada uno de los antibióticos usados (Tabla 4, Figura 3), esto puede estar asociado a varios factores como son la inadecuada terapia antibacteriana y el uso de antibióticos genéricos, lo que genera tasas de resistencia cada vez mayores.<sup>16</sup> Estos resultados indican que la emergencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antimicrobianos es un problema de salud pública no solo a nivel local sino también a nivel nacional<sup>53-55</sup>, en Colombia se han reportado niveles de resistencia a cefalosporinas del 44% para esta especie.<sup>54</sup>

**Tabla 4.** Concentraciones mínimas inhibitorias de aislados resistentes de *Klebsiella pneumoniae*.

CEPA	CMI ( µg/mL)											
	CAZ	CZ	CTX	AK	CF	CXM	C	IMI	ATM	CIP	GN	AMC
4	256	32	4	64	32	32	16	4	16	32	64	4
6	32	128	4	64	>256	16	256	8	64	32	64	8
8	64	32	16	64	>256	64	256	4	32	32	64	4
9	32	>256	64	128	>256	64	8	4	64	>64	>128	8
12	>256	>256	>512	64	>256	>256	64	4	>256	16	32	8
18	16	>256	16	32	>256	32	64	4	32	32	64	4
22	16	8	4	24	32	64	128	2	64	32	64	4
23	16	>256	>512	32	>256	>256	8	4	>256	32	64	4
28	>256	>256	512	32	>256	>256	64	4	>256	32	64	4
REF	4	64	<1	32	4	32	32	4	64	32	16	2

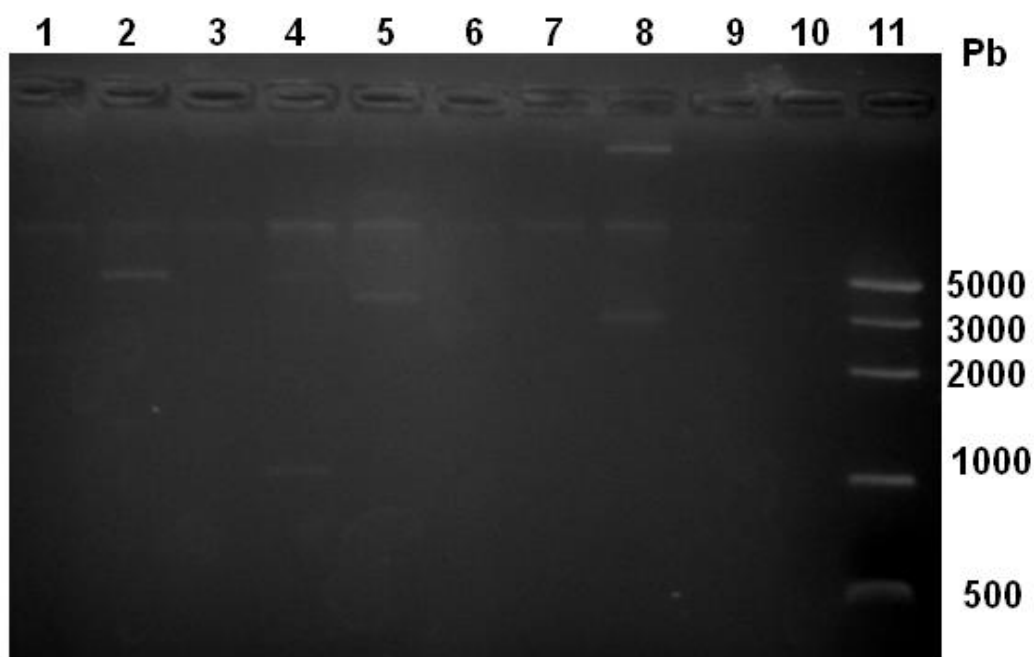
**CAZ:** ceftazidima, **CZ:** cefazolina, **CTX:** cefotaxima, **AK:** amikacina, **CF:** cefalotina, **CXM:** cefuroxima, **C:** cloranfenicol, **IMI:** imipenem, **ATM:** aztreonam, **CIP:** ciprofloxacina, **GN:** gentamicina, **AMC:** amoxicilina ácido clavulánico, **REF:** cepa de referencia ATCC13883 como control negativo.



**Figura 3.** Concentración mínima inhibitoria para la cepa N° 12 en medio LB suplementado con las máximas concentraciones de cada antibiótico.

**A:** CAZ, >256; **B:** CZ, >256; **C:** CTX, >512; **D:**CF, >256; **E:** CXM, >256; **F:** ATM, >256.

**7.3 Variabilidad genética por perfil plasmídico:** el perfil plasmídico mostró que cada una de las cepas varía en número de bandas de ADN. La cepa de referencia no mostró ninguna banda mientras que las demás cepas presentaron de 1 a 5 bandas (Figura 4, Tabla 5), se asume que la concentración de los plásmidos fue baja, debido a que las bandas se observaron muy claras, la cepa que mostró bandas con mayor intensidad fue la numero 23. El perfil molecular de los aislados muestra la diversidad entre el ADN plasmídico de cepas dentro de una misma especie, debido posiblemente a las altas tasas de conjugación que presenta la especie, incluso con otros géneros <sup>56,57</sup> el material genético adquirido puede hacer variar los perfiles fenotípicos de resistencia; tal como se observo en las cepas incluidas en este estudio, demostrando que la población de *Klebsiella pneumoniae* del estudio es diversa.



**Figura 4.** Perfil plasmídico de aislados resistentes a antimicrobianos de *Klebsiella pneumoniae*.  
**1:** cepa 4; **2:** cepa 6; **3:** cepa 8; **4:** cepa 9; **5:** cepa 12; **6:** cepa 18; **7:** cepa 22; **8:** cepa 23; **9:** cepa 28; **10:** control negativo; **11:** marcador molecular Easy Ladder II 500- 5.000 pb.

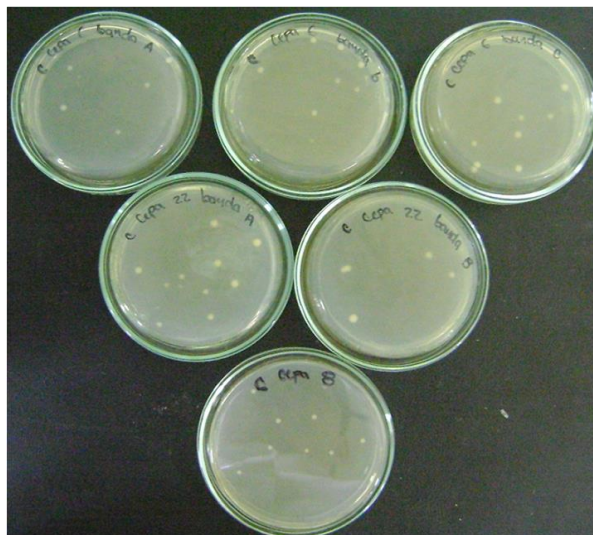
**Tabla 5.** Número de bandas observadas en el perfil plasmídico para cada cepa resistente de *Klebsiella pneumoniae*.

CEPA	4	6	8	9	12	18	22	23	28	REF
Nº DE BANDAS	2	3	1	5	3	2	2	3	2	0

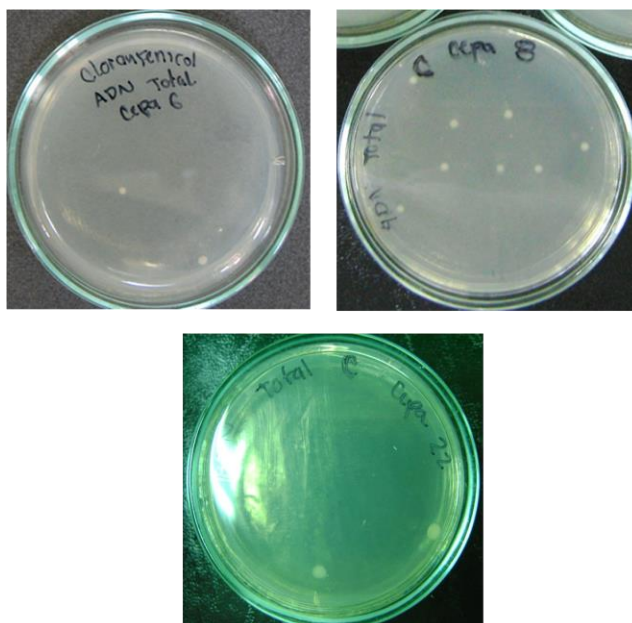
**7.4 Demostración de la transmisión de plásmidos que generan resistencia por transformación:** Solo los ensayos realizados con la cepa de referencia *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 expresaron resistencia. A pesar de la facilidad de *E. coli* DH5 $\alpha$  para recibir ADN de otras bacterias pertenecientes a las enterobacterias, no se observó transformación usando esta cepa. Las células sometidas a la transformación usando las bandas de los aislados 6, 8 y 22 mostraron resistencia al cloranfenicol (Figura 5), usando cada banda purificada del perfil y el ADN total plasmídico de los aislados (Figura 6), lo que demuestra que el resto de resistencias observadas fenotípicamente, probablemente sean de origen cromosomal. Otros mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos, como la impermeabilidad de la membrana debida a la pérdida de porinas, las bombas de flujo de expulsión y varios tipos de degradación enzimática se han reportado previamente



para *Klebsiella pneumoniae* como resultado de la expresión de genes que se encuentran en el cromosoma bacteriano, lo que podría explicar el resto de las resistencias presentes en la población estudiada.<sup>58-60</sup>



**Figura 5.** Colonias de células transformadas de *Klebsiella pneumoniae* con resistencia a cloranfenicol (50µg/mL) en medio Mueller Hilton usando cada una de las bandas purificadas de los aislados resistentes.

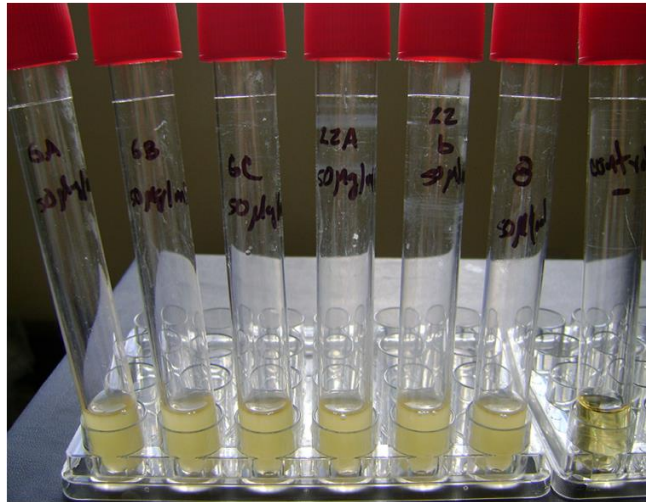


**Figura 6.** Colonias de células transformadas de *Klebsiella pneumoniae* con resistencia a cloranfenicol (50µg/mL) en medio Mueller Hilton usando el ADN plasmídico total de los aislados resistentes.

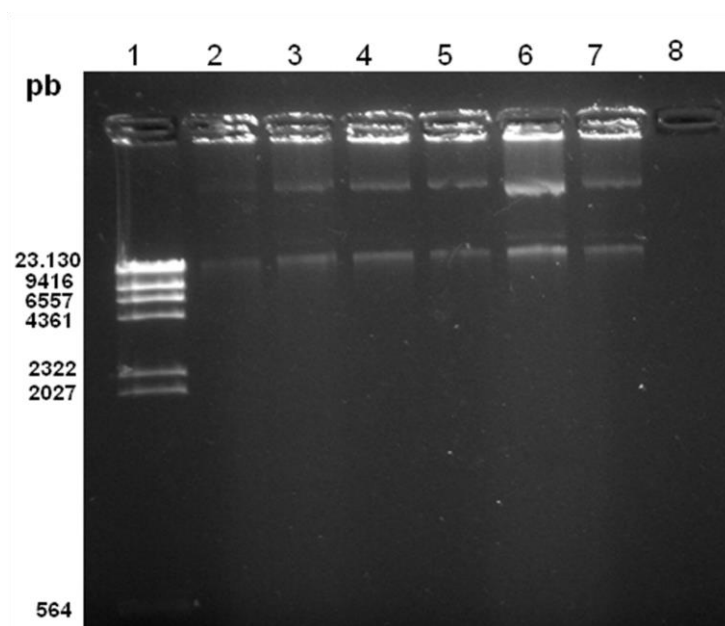
Esta información es valiosa ya que la resistencia al cloranfenicol, por ser de origen plasmídico puede transferirse fácilmente a otras especies. Teniendo en cuenta que el cloranfenicol es usado en el tratamiento contra infecciones por *Klebsiella pneumoniae* solo cuando la cepa presenta resistencia a todas las céfalosporinas, encontrar fenotipos resistentes a cloranfenicol en muestras clínicas advierte la dificultad del tratamiento de las infecciones con estas cepas.

Posterior a la transformación, las células fueron resistentes a cloranfenicol en concentraciones mayores a las de las aisladas clínicamente, lo que indico para este estudio que la resistencia se transfirió efectivamente (Figura 7). La extracción de ADN plasmídico en los cultivos de células transformadas dio lugar a un patrón de bandeo diferente al del ADN plasmídico extraído de los aislados clínicos. A pesar de que la transformación de *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 se hizo con cada una de las bandas de los aislados, el perfil posterior a la transformación mostró tres bandas (Figura 8), esto es fácilmente explicado ya que los plásmidos dentro de las células toman conformaciones estructurales diferentes que pueden mantenerse durante el aislamiento y el corrido electroforetico<sup>61</sup> (Figura 8). Una de las formas es llamada "superenrollada" en esta, el ADN esta retorcido sobre sí mismo, esta torsión o superenrollamiento hace que la molécula sea muy compacta y por lo tanto se moverá a través de un gel muy rápido.

Una segunda forma de plásmidos se llama "círculo-relajado", a menudo, un plásmido experimenta un descanso en uno de los enlaces covalentes situados en la unión azúcar fosfato a lo largo de una de las dos hebras de nucleótidos, repetidos procesos de congelación y descongelación de los plásmidos u otros factores físicos bruscos, pueden provocar la ruptura; cuando esta ruptura se produce, la tensión almacenada en el plásmido superenrollado se libera y el plásmido se desenrolla. Este plásmido en forma relajada no se mueve a través del gel con la misma facilidad que la forma superenrollada, aunque es del mismo tamaño en términos de pares de bases, se encuentra más cerca del pozo que la forma superenrollada. La última forma plasmídica es comúnmente llamada "multimerica," cuando las bacterias replican los plásmidos, lo hacen rápidamente, por lo que con frecuencia acaban unidos como eslabones de una cadena. Así cuando dos plásmidos están unidos, el multimer será dos veces más grande que un solo plásmido y así migrara muy lentamente a través del gel.<sup>62</sup> De hecho, se moverá más lento que la forma relajada.



**Figura 7.** Cultivo positivo de células transformadas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a cloranfenicol en medio líquido.



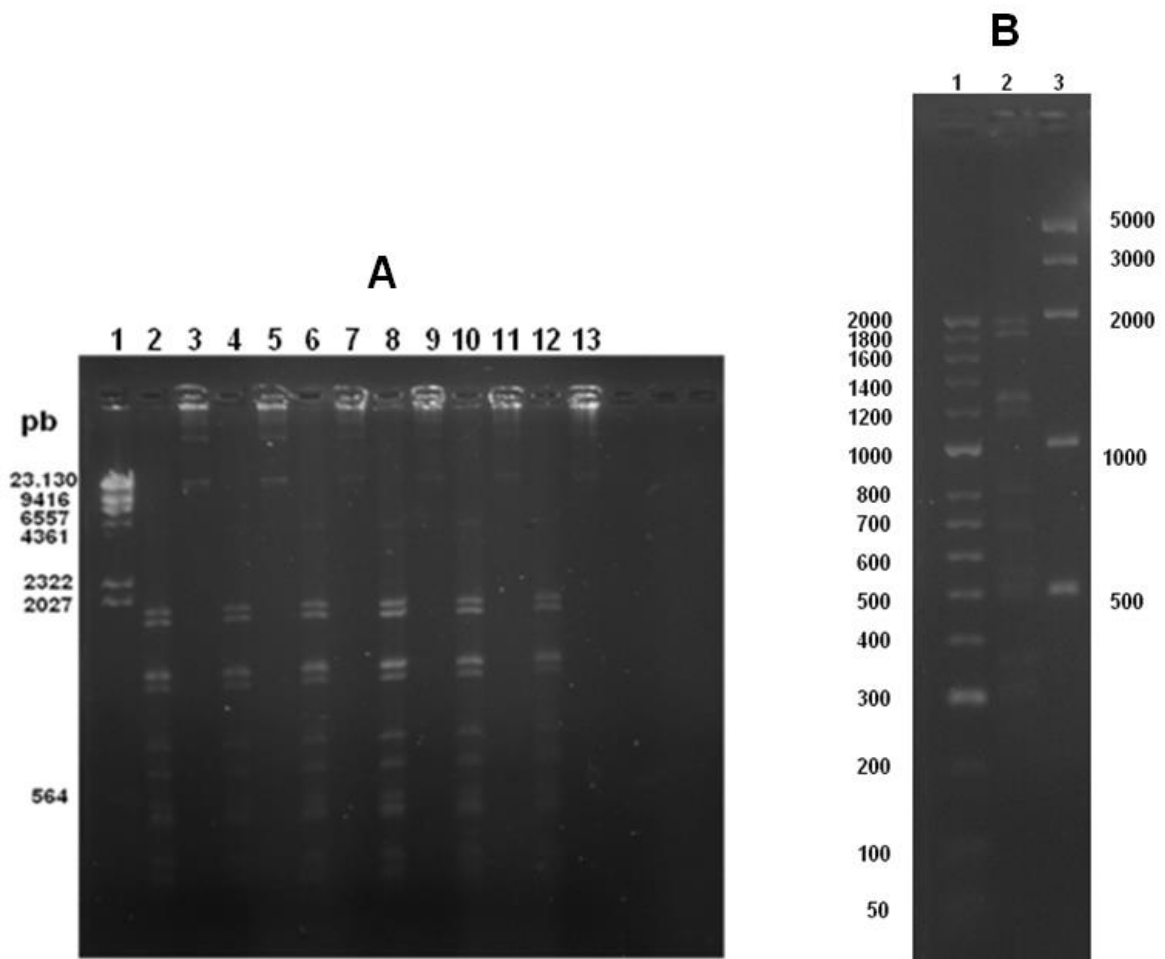
**Figura 8.** Perfil de ADN plasmídico en células transformadas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a cloranfenicol.

**1:** marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind* III **2, 3 y 4:** células transformadas con tres bandas de ADN de la cepa 6. **5:** células transformadas con ADN de la cepa 8. **6 y 7:** células transformadas con 2 bandas ADN de la cepa 22 **8:** control negativo, *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 sin ADN plasmídico.

Con la finalidad de determinar si las bandas correspondían a un mismo plásmido que se encontraba en diferentes configuraciones se realizó la restricción con varias enzimas. La enzima *Taq I* mostro 9 cortes dentro de los plásmidos y además la restricción de los plásmidos observados en las células transformadas dieron lugar a un patrón de bandeos idéntico entre todas las cepas; lo que confirma que, la resistencia al cloranfenicol, es mediada por un solo plásmido presente en todas las cepas que presentaron resistencia a este antibiótico y que además, las tres bandas observadas en el gel, corresponden a un solo plásmido en diferentes configuraciones (Figura 9).

Plásmidos anteriormente caracterizados han mostrado evidencia de haber integrado genes que codifican enzimas como aminoglucósidos, acetiltransferasas, adenililtransferasas, betalactamasas, dihidrofolato reductasas y en especial a acetiltransferasas las cuales son responsables de la resistencia a cloranfenicol por mono y diacetilacion lo que evita la unión subsecuente del cloranfenicol a la subunidad ribosomal 50S <sup>63</sup>. Varios genes CAT (*cat*; de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, <sup>64</sup> *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumilus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter coli*, y *Streptomyces acrimycini*) han sido secuenciados, y todos muestran un alto grado de similaridad en la enzima, especialmente alrededor del sitio activo, aunque esto puede presumirse como evidencia de la capacidad de diseminar las acetiltransferasas horizontalmente, se ha encontrado que entre las especies se difiere en su regulación; esta enzima en gram positivas es inducible, mientras que, en gram negativas es constitutiva en niveles y conformación basales que no dan resistencia natural al cloranfenicol <sup>65</sup>

Además la resistencia a este antibiótico también puede ser debida a un mecanismo menos frecuente, el cual no involucra la modificación del compuesto, sino su entrada en la célula bacteriana, este ha sido apropiadamente llamado no enzimático y se ha observado principalmente en gram negativas. Los factores genéticos de estos mecanismos son usualmente codificados por plásmidos, y suelen estar presentes en especies como *Pseudomona aeruginosa* y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, lo que es concordante con los resultados encontrados en este trabajo, mientras que los determinantes de resistencia de origen cromosomal a cloranfenicol han sido reportados mayormente en *Haemophilus influenza*, *Pseudomona cepacia* y *Salmonella thypi*.<sup>65</sup>



**Figura 9.** Patrón de restricción usando *Taq I* de plásmidos con resistencia a cloranfenicol en células transformadas de *Klebsiella pneumoniae*.

**A:** 1: marcador de peso molecular  $\lambda$  *Hind III*. 2, 4 y 6: restricción de plásmidos de la cepa 6; 3, 5 y 7: control plásmidos sin cortar de la cepa 6; 8: restricción de plásmidos de la cepa 8; 9: control plásmidos sin cortar de la cepa 8. 10 y 12: restricción de plásmidos de la cepa 22. 11 y 13: control plásmidos sin cortar de la cepa 22.

**B:** 1: marcador de peso molecular *Hyperladder II*; 2: restricción de plásmido que confiere resistencia a cloranfenicol usando la enzima *Taq I*; 3: marcador de peso molecular *Easy Ladder II*.

## 8. CONCLUSIONES

Este es el primer informe en Armenia en el que se caracteriza fenotípica y molecularmente cepas de *K. pneumoniae*, en el cual se muestra una alta y preocupante tasa de cepas resistentes a diferentes antimicrobianos.

Los perfiles de sensibilidad por el método de Kirby – Bauer (difusión en disco), fueron concordantes con las concentraciones mínimas inhibitorias.

La única resistencia encontrada en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* asociada a ADN plasmídico fue la resistencia al cloranfenicol. Esto indica que la mayoría de resistencias a los diferentes antimicrobianos son de origen cromosomal.

Solo el ensayo de transformación usando la cepa de referencia *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883, fue viable para la expresión de los plásmidos extraídos a partir de los aislados clínicos, a pesar de que la cepa de referencia *E. coli* DH5  $\alpha$  es una especie perteneciente a la familia de las enterobacterias al igual que las especies del género *Klebsiella*.

La investigación demostró la importancia de la caracterización fenotípica y molecular, ya que es una herramienta útil para estudios básicos, facilitando así el conocimiento de los perfiles de resistencia a antibióticos en microorganismos.

## 9. RECOMENDACIONES

Se deben tomar medidas de prevención en cuanto a la diseminación de cepas resistentes de *Klebsiella pneumoniae*, debido a que su resistencia, por ser de origen plasmídico, puede ser fácilmente diseminada entre otras cepas de la misma especie, incluso en cepas de géneros diferentes.

La caracterización fenotípica y molecular contribuye al entendimiento de la resistencia en *Klebsiella pneumoniae*, demostrando que son puntos claves que aportan evidencia para implementar estrategias futuras que ayuden a combatir los microorganismos emergentes con resistencia a los agentes antimicrobianos.

Se sugiere la caracterización completa del plásmido que confiere resistencia al cloranfenicol y su secuenciación, así se podría generar un valioso aporte al conocimiento de los diferentes plásmidos que confieren resistencia a antimicrobianos en la especie.

## 10. REFERENCIAS

1. Podschun, R., Ullmann, U. 1998. *Klebsiella* ssp. As Patogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Review*, 11(4): 589-603.
2. Bagley, S. T., Seidler, R. J., Talbot, H.W., Morrow, J.E. 1978. Isolation of *Klebsiellae* from within living wood. *Appl. Environ. Microbiol*, 36:178-185.
3. Brown, C., Seidler, R. J. 1973. Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Appl. Microbiol*; 25:900-904.
4. Edberg, S.C., Piscitelli, V., Cartter, M. 1986. Phenotypic characteristics of coliform and noncoliform bacteria from a public water supply compared with regional and national clinical species. *Appl. Environ. Microbiol*; 52: 474-478.
5. Podschun, R., Pietsch, S., Holler, C., Ullmann, U. 2001. Incidence of *Klebsiella* Species in surface water and their expression of virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7):3325-3327.
6. Matsen, J. M., Spindler, J. A., Blosser, R. O. 1974. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *Appl. Microbiol*, 28:672-678.
7. Calderón, R., Sacsquispe, R., Pasterán, F., Galas, M., Soto, J., Riveros, J., Valencia, A., Silva, N., Suárez, V., Montoya, I. 2003. Caracterización Molecular De *Klebsiella Pneumoniae* Y *Enterobacter Cloacae* Productoras De  $\beta$ -Lactamasas De Espectro Extendido Tipo Shv-5 en una Unidad de cuidados intensivos neonatal de Lima. *Rev. Perú med exp salud pública*; 20 (3):121-127.
8. Maggi, L., Paya, E., Nercelles, P., Cordovez, A., Martínez, J., Prado, V., Squella, F., Mendoza, C. 1994. Perfil plasmidial de *Klebsiella pneumoniae* cepas endémicas y aisladas de brotes en una unidad de neonatología. *Rev. Chil. Pediatr*, 65 (1): 1-6.
9. Nassif, X., Sansonetti, P. 1986. Correlation of the Virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the Presence of a Plasmid Encoding Aerobactin. *Infection and Immunity*, 54 (3): 603-608.
10. Andrade, V. 2004. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la B-lactamasa SHV-5 en una unidad de cuidados intensivos. *Salud Publica Mex*, 46 (6): 524-528.
11. Bingen, E., Desjardins, P., Arlet, G., Bourgeois, F., Kurkdjian, P., Lambert-Zechovsky, N., Denamur, E., Philippon, A., Elion, J. 1993. Molecular Epidemiology of Plasmid Spread among Extended Broad-Spectrum- Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Pediatric Hospital. *Journal Of Clinical Microbiology*, 31(2):179-184.
12. Casellas, J., Nannini, E., Radice, M., Cocconi, E., Lejona, S., Borda, N., Peres, M., Tomé, G., Marí, R., Notario, R., Truscillo, M., Lovesio, C., Gutkind, G., Fay, F. 2005. Estudio de un brote debido a aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en un centro asistencial de Rosario – Argentina. *Rev Panam Infectol*; 7(4):21-27.
13. Espinal, P. A., Mantilla, J. R., Saavedra, C. H., Leal, A. L., Alpuche, C., Valenzuela, E. M. 2004. Epidemiología Molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido. *Biomédica*; 24:252-261.
14. Sorensen, S., Bailey, M., Hansen, L., Kroer, N., Wuert, E. 2005. studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. *Nature*; 3:700-710.
15. Molbak, L. 2003. The plasmid genome database. *Microbiology* 149: 3043-3045
16. Tenover, F. C. 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*; 119 (6A):3-10.
17. Vila, J., Marti, S., Sanchez, J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 59:1210-1215.
18. Máttar, S., Martínez, P. 2007. Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las B-lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología *Infectio*; 11(1):23-25.
19. Alexopoulos, A., Voidarou, C., Stefanis, C., Papadopoulos, I., Vavias, S., Tsiotsias, A., Kalkani, E., Charvalos, E., Bezirtzoglou, E. 2006. Antibiotic resistance profiles and integrons in *Enterobacteriaceae* from the riverside of Evros-Ardas with respect to chemical and waste pollution. *Microbial Ecology in Health and Disease*; 18: 170-176.



20. Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M., Schreckenberger P. C., Winn W. C. 2001. Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a Color. Primera Reimpresión de la Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 207-210.
21. Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A., Rousselier, P. 2001. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 51: 925–932.
22. Seidler, R., Knittel, M., Brown, C. 1975. Potential Pathogens in the Environment: Cultural Reactions and Nucleic Acid Studies on *Klebsiella pneumoniae* from Clinical and Environmental Sources. *American Society for Microbiology*; 29(6):819-825.
23. Schembri, M., Dalsgaard, D., Klemm, P. 2004. Capsule Shields the Function of Short Bacterial Adhesins. *Journal of Bacteriology*; 186(5): 1249–1257.
24. Schembri, M., Blom, J., Krogfelt, K., Klemm, P. 2005. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*; 73(8): 4626–4633.
25. Podschun, R., Ullmann, U. 1992. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J. Med. Microbiol*; 36:250–254.
26. Williams, P., Lambert P. A., Brown, M. R., Jones, R. J. 1983. The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J. Gen. Microbiol*; 129:2181–2191.
27. Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Vaisanen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F., Orskov, I., Svenson, S. B., and Makela P. H. 1985. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect. Immun*; 48:486–491.
28. Bender, L., Blum, G., Schmittroth, M., Achtman, M., Tschape, H., Hacker, J. 1991. Virulence patterns and long-range genetic mapping of extraintestinal *Escherichia coli* K1, K5, and K100 isolates: use of pulsed-field gel electrophoresis. *Infect. Immun*; 59:2664–2672.
29. Neu, H. C. 1992. The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science*; 257(21):1064-1073.
30. Tafur, J., Torres, J., Villegas, M. 2008. Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Infectio*; 12(3):217-226.
31. Boyd, D., Tyler, S., Christianson, S., McGeer, A., Muller, M., Willey, B., Bryce, E., Gardam, M., Nordmann, P., Mulvey, M. 2004. Complete Nucleotide Sequence of a 92-Kilobase Plasmid Harboring the CTX-M-15 Extended-Spectrum Beta-Lactamase Involved in an Outbreak in Long-Term-Care Facilities in Toronto, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; Vol. 48(10): 3758–3764.
32. Wei Wu, S., Dornbusch, K., Kronvall, G., Norgren, M., 1999. Characterization and Nucleotide Sequence of a *Klebsiella oxytoca* Cryptic Plasmid Encoding a CMY-Type b-Lactamase: Confirmation that the Plasmid-Mediated Cephamycinase Originated from the *Citrobacter freundii* AmpC b-Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 43(6): 1350–1357.
33. Lee, K., Yong, D., Choi, Y., Yuma, J., Kimb, J., Woodford, N., Livermore, D., Chonga, Y. 2007. Reduced imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with plasmid mediated CMY-2 and DHA-1 b-lactamases co-mediated by porin loss. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 29:201-206.
34. Sarno, R., McGillivray, G., Sherratt, D., Actis, L., and Tolmasky, M. 2002. Complete Nucleotide Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Multiresistance Plasmid pJHCMW1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 46(11): 3422–3427.
35. Tolmasky, M., Roberts, M., Woloj, M., and Crosal, J., 1986. Molecular Cloning of Amikacin Resistance Determinants from a *Klebsiella pneumoniae* Plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 30(2): 315-320.
36. Woloj, M., Tolmasky, M., Roberts, M., Crosal, J. 1986. Plasmid-Encoded Amikacin Resistance in Multiresistant Strains of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Neonates with Meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 29(2): 315-319.
37. Nassif, X., Sansonetti, P. J. 1986. Correlation of the Virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the Presence of a Plasmid Encoding Aerobactin. *Infection and Immunity*; 54(3) P. 603-608.
38. Nassif, X., Fournier, J., Arondel, J., and Sansonetti, P., 1989. Mucoid Phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a Plasmid-Encoded Virulence Factor. *Infection and Immunity*; 57 (2): 546-552.
39. Rodríguez, J., Pascual, A., García, I., and Martínez, L. 2003. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella*

- pneumoniae* producing AmpC-type  $\beta$ -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 52:703–706.
40. Wang, M., Sahm, D., Jacoby, G., and Hooper, D. 2004. Emerging Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Associated with the *qnr* Gene in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 48(4):1295-1299.
  41. Kaczmarek, F., Dib-Hajj, F., Shang, W., and Gootz, T. 2006. High-Level Carbapenem Resistance in a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate Is Due to the Combination of bla<sub>ACT-1</sub> Lactamase Production, Porin OmpK35/36 Insertional Inactivation, and Down-Regulation of the Phosphate Transport Porin PhoE. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 50(10) 3396–3406.
  42. Ohana, S., Leflon, V., Ronco, E., Rottman, M., Guillemot, D., Lortat-Jacob, S., Denys, P., Loubert, G., Chanoine, M., Gaillard, J., Lawrence, C. 2005. Spread of a *Klebsiella pneumoniae* Strain Producing a Plasmid-Mediated ACC-1 AmpC-Lactamase in a Teaching Hospital Admitting Disabled Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 49(5):2095–2097.
  43. Horii, T., Arakawa, H., Ohta, M., Ichiyama, S., Wacharotayankun, R., And Kato, N. 1993. Plasmid-Mediated AmpC-Type 1-Lactamase Isolated from *Klebsiella pneumoniae* Confers Resistance to Broad-Spectrum, B-Lactams, Including Moxalactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 37 (5): 984-990.
  44. Songa, W., Kima, J., Kima, H., Yongb, D., Jeongc, S., Parka, M., Man, K. 2006. Increasing trend in the prevalence of plasmid-mediated AmpC b-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal ampC gene at a Korean university hospital from 2002 to 2004. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*; 55: 219–224.
  45. Hennequin, C., Forestier, C. 2007. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. *Research in Microbiology*; 20:1-9.
  46. Thatte, V., Gill, S., Lyer, V. 1985. Regions on Plasmid pCU1 Required for the Killing of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*; 163(3):1296-1299.
  47. Merck E.1994. Manual de Medios de Cultivo. Darmstadt, Alemania. REG. NR. 1751-01.
  48. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement. 2006. *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 26(3) M100-S16.
  49. Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, the third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1.116.
  50. Espinal, P. A., Mantilla, J. R., Saavedra, C., Leal, A., Alpuche, C., Valenzuela, E. M. 2004. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido. *Biomédica*; 24:252-261.
  51. Martínez, P., Mercado, M., Máttar, S. 2003. Determinación de betalactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del hospital San Jerónimo, Montería. *Colombia Médica*. 34 (4): 196-205.
  52. Sánchez, L., Ríos, R., Máttar, S. 2008. Detección de beta-lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aislados en una clínica de Villavicencio, Colombia. *Infectio*; 12 (3):193-200.
  53. Bradford, P. A. 2001. Extended-Spectrum beta-lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(4): 933–951.
  54. Martínez, P. J., Espinal, P. A., Bustos, A., Mattar, S. 2005. Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería. *Med. UNAB*; 8 (1):15-22.
  55. Paterson, D. L., Bonomo, R. A. 2005. Extended-Spectrum b-lactamases: a Clinical Update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(4): 657–686.
  56. Bennett, P. M. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*; 153, S347–S357.
  57. Paterson, D. 2006. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *The American Journal of Medicine*; 119 (6A), S20–S28.
  58. Alberti, S., Rodríguez, F., Schirmer, T., Rummel, G., Tomas, J., Rosenbusch, J., Benedi, V. 1995. A Porin from *Klebsiella pneumoniae*: Sequence Homology, Three-Dimensional Model, and Complement Binding. *Infection and Immunity*; 63 (3): 903–910.

59. Domenech, A., Martínez, L., Hernandez, S., Conejo, M., Pascual, A., Tomas, J., Alberti, S., Benedí, V. 2003. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 Porin in Antimicrobial Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47(10): 3332–3335.
60. Domenech, A., Hernandez, S., Martínez, L., Benedí, V., Alberti, S. 1999. Identification and Characterization of a New Porin Gene of *Klebsiella pneumoniae*: Its Role in  $\beta$ -Lactam Antibiotic Resistance. *J. Bacteriol.* 181(9): 2726–2732.
61. Schleef, M., Schmidt, T. 2001. Analysis of plasmid DNA by capillary gel electrophoresis, PlasmidFactory GmbH & Co. KG, Meisenstr. 96, D-33607 Bielefeld, Germany.
62. Wallace, A. B. 2002. Introduction to Plasmids and Restriction Enzymes. Guide of Biotechnology Lab Program.1-11.
63. Bissonnette, L., Champetier, S., Buisson, J., Roy, P. 1991. Characterization of the Nonenzymatic Chloramphenicol Resistance (cmlA) Gene of the 1n4 Integron of Tn1696: Similarity of the Product to Transmembrane Transport Proteins. *J. Bacteriol.* 173(14): 4493-4502.
64. Charles, I. G., Harford, S., Brookfield, J. F., Shaw, W. V. 1985. Resistance to Chloramphenicol in *Proteus mirabilis* by Expression of a Chromosomal Gene for Chloramphenicol Acetyltransferase. *J. Bacteriol.* 164(1): 114-122.
65. Parent, R., ROY, P. 1992. The Chloramphenicol Acetyltransferase Gene of Tn2424: a New Breed of cat. *J. Bacteriol.* 174(9): 2891-2897.