



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Klebsiella pneumoniae* PORTADORES DEL GEN *bla*_{NDM-1} PROCEDENTES DE UNA UNIDAD NEONATAL EN UN HOSPITAL DE BOGOTÁ

MARIA VICTORIA MONCADA GUAYAZÁN

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSGRADO DE INTERFACULTADES DE MICROBIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C., COLOMBIA
2014.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS DE *Klebsiella pneumoniae* PORTADORES DEL GEN *bla*_{NDM-1} PROCEDENTES DE UNA UNIDAD NEONATAL EN UN HOSPITAL DE BOGOTÁ

MARIA VICTORIA MONCADA GUAYAZÁN

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:

Magíster Scientae en Microbiología

Director:

Javier Antonio Escobar Pérez
Químico, M.Sc. en Bioquímica, Ph D (c) en Biotecnología

Codirectora:

Emilia María Valenzuela
Química Farmacéutica, M.Sc. en Microbiología

Línea de Investigación:

Microbiología y Biología Molecular de Agentes Infecciosos

Grupo de Investigación:

Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana-Univ. el Bosque

Universidad Nacional De Colombia

Facultad de Ciencias

Posgrado de Interfacultades de Microbiología

Bogotá D.C., Colombia

2014.

*“La ciencia es la verdadera escuela moral;
ella enseña al hombre
el amor y el respeto a la verdad,
sin el cual toda la esperanza es quimérica”*

(Pierre Eugène Marcellin Berthelot)

Agradecimientos

A Dios por permitirme esta oportunidad de crecer no solo como profesional e investigadora, sino también como persona. A mi familia y en especial a Luis, por las constantes demostraciones de comprensión y apoyo, aún en los momentos difíciles.

Al Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana; en especial a Javier Escobar, quién me brindó la oportunidad de empezar de cero, de crecer como profesional y de lograr este sufridísimo pero reconfortante sueño con sacrificio y esfuerzo, por la paciencia y comprensión y por todo lo que pude aprender durante este tiempo. A mis compañeros del laboratorio; Betsy, Alejo y Zaydis por estrechar su mano, por mostrarme la luz al final del túnel y por aguantarme en mis momentos de angustia y estrés!!

A la profe Emilia, quien me acogió y me brindó su apoyo y comprensión, y de quien sentí ese cariño maternal de una manera tierna y bondadosa.

A Socorrito, porque casi que padeció conmigo todo este recorrido como estudiante de la maestría, porque siempre me dio palabras de aliento y de esperanza, porque fue paciente y porque fue como otra mamá en la Universidad.

A todos los docentes del posgrado, de quien pude aprender lecciones de vida; a la profe Marta Fontanilla porque siempre encontré en ella su apoyo y comprensión.

Y a todos mis compañeritos del posgrado con quien disfruté, reí y lloré; en especial a Carlitos Barragán y Carlitos Cruz, a mi coterráneo Julito Ríos y una amiguita más Vanessa Flórez, por su contagiosa alegría. Keile Brugés, la comadre porque siempre encontré palabras de aliento.

Y a todos y cada uno de ustedes que hicieron parte de mi recorrido, de mi lección de vida, de mis sufrimientos, alegrías y de lo bendecida que estoy por tenerlos en mi vida.

Gracias.... totales!!!!

Resumen

El estudio de 6 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos aislados en pacientes de una unidad neonatal y enmarcado en un sistema de vigilancia epidemiológica a nivel hospitalario, logró identificar por primera vez en nuestro país y Suramérica aislamientos productores de la metalo- β -lactamasa tipo NDM-1. El propósito de este estudio fue determinar las características moleculares y genéticas en dichos aislamientos; así como, caracterizar las posibles estructuras de movilización responsables de la emergencia y/o diseminación de este gen en nuestro país. Análisis moleculares mostraron que todos los aislamientos presentan el gen *bla_{NDM-1}* y genes en casete *aadB-catB3* en un plásmido conjugativo ≥ 170 Kb del grupo de incompatibilidad A/C. Fueron relacionados clonalmente mediante PFGE y la tipificación de secuencias de múltiples locus mostró que todos los aislamientos son ST1043, diferente a los ST reportados previamente en NDM, sugiriendo la emergencia de NDM en nuestro país de manera distinta a lo encontrado con *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC, el cual se debe casi exclusivamente a la diseminación del clon ST258.

Palabras clave: Carbapenemasas, NDM-1, *Klebsiella pneumoniae*, resistencia antimicrobiana, UCI, Colombia.

Abstract

The study of six isolates of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in patients of a neonatal unit and framed in a surveillance system in hospitals, identified for the first time in our country and South America isolates producing the metallo- β -lactamase type NDM-1. The purpose of this study was to determinate the molecular and genetic features in these isolates; as well as characterize potential mobilizing structures responsible for the emergence and / or spread of this gene in our country. Molecular analysis showed that all the isolates have the *bla_{NDM-1}* gene and gene cassette array *aadb-catB3* in a conjugative plasmid ≥ 170 kb of the incompatibility group A / C. Were clonally related by PFGE and multilocus sequence typing showed that all isolates were ST1043, unlike the ST previously reported in NDM, suggesting the emergence of NDM in our country differently from what have found in KPC producing *Klebsiella pneumoniae*, which is almost entirely due to the spread of clone ST258.

Keywords: Carbapenemase, NDM-1, *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance, ICU, Colombia

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VII
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas.....	XIV
Lista de abreviaturas	XV
Introducción.....	1
Antecedentes.....	5
Justificación	8
Preguntas de investigación	10
1. Objetivo general.....	11
1.1. Objetivos específicos.....	11
2. Marco conceptual.....	13
2.1. Antibióticos β -lactámicos.....	13
2.2. Mecanismos de resistencia a β -lactámicos.....	16
2.2.1. β -lactamasas.....	16
2.3. Carbapenemasas	18
2.3.1. Metallo- β -lactamasas	19
2.3.2. Enzimas tipo NDM	21
3. Materiales y métodos.....	25
3.1. Diseño experimental	25
3.2. Tipo de estudio.....	26
3.3. Aislamientos bacterianos y cepas control.....	26
3.4. Caracterización molecular y genética de los aislamientos hospitalarios.....	27
3.4.1. Susceptibilidad a antibióticos.....	27
3.4.2. Detección molecular de genes de resistencia a antibióticos	27
3.4.3. Evaluación de la relación genética entre los aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> portadores del gen <i>bla_{NDM}</i>	29
3.5. Detección y caracterización de las posibles plataformas de movilización del gen <i>bla_{NDM}</i>	30
3.6. Evaluación del entorno genético del gen <i>bla_{NDM}</i>	31
4. Resultados	33
4.1. Origen de los aislamientos	33

4.2. Caracterización molecular y genética de los aislamientos hospitalarios de <i>Klebsiella pneumoniae</i> portadores del gen <i>bla_{NDM}</i>	34
4.2.1. Susceptibilidad a antibióticos	34
4.2.2. Detección molecular de genes de resistencia a antibióticos	35
4.2.3. Evaluación de la relación genética entre los aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> portadores del gen <i>bla_{NDM}</i>	36
4.3. Detección y caracterización de las posibles plataformas de movilización del gen <i>bla_{NDM}</i>	37
4.4. Evaluación del entorno genético del gen <i>bla_{NDM}</i>	40
5. Discusión	43
6. Conclusiones	49
Anexo A: Alineamiento de la secuencia obtenida por amplificación y secuenciación del gen <i>bla_{NDM}</i> en el aislamiento 16KP1	51
Anexo B: Identificación parcial de diferentes plásmidos en 16KP2 por medio del programa PlasmidFinder	52
Bibliografía.....	53

Lista de figuras

<i>Figura 1. Estructura química de antibióticos β-lactámicos según su clasificación</i>	13
<i>Figura 2. Cadenas laterales de las diferentes penicilinas</i>	14
<i>Figura 3. Estructuras químicas de los principales carbapenems</i>	15
<i>Figura 4. Representación global de las enzimas tipo MBLs móviles</i>	20
<i>Figura 5. Distribución mundial de NDM-1 en aislamientos de E. coli y K. pneumoniae</i>	21
<i>Figura 6. Esquema de las estructuras que rodean el gen bla_{NDM}</i>	23
<i>Figura 7. Esquema del análisis del entorno genético del gen bla_{NDM}</i>	31
<i>Figura 8. Resultados relación genética entre aislamientos NDM y comparación con lo reportado</i>	37
<i>Figura 9. Confirmación molecular y evaluación de plasmidos transferidos en transconjugantes</i>	39
<i>Figura 10. Perfil de restricción plasmídico y resueltos mediante PFGE en diferentes aislamientos</i>	40
<i>Figura 11. Evaluación del entorno genético del gen bla_{NDM-1} en la cepa 16KP1.</i>	41
<i>Figura 12. Comparación del entorno genético del aislamiento 16KP1</i>	42

Lista de tablas

<i>Tabla 1. Clasificación funcional de β-lactamasas</i>	17
<i>Tabla 2. Iniciadores empleados para la detección de genes de resistencia a diferentes antibióticos</i>	29
<i>Tabla 3. Iniciadores empleados para el análisis del entorno genómico de bla_{NDM}</i>	32
<i>Tabla 4. Características clínicas y microbiológicas de los aislamientos bla_{NDM}</i>	35
<i>Tabla 5. Caracterización molecular de la resistencia a antibióticos en los aislamientos hospitalarios.</i>	36
<i>Tabla 6. Evaluación microbiológica y molecular de la resistencia transferida a antibióticos</i>	38

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
Rif	Rifampicina
Az	Azida de sodio
Nal	Acido nalidíxico
Te	Tetraciclina
S	Estreptomina
IPM	Imipenem
MEM	Meropenem
ETP	Ertapenem
AZT	Aztreonam
CTX	Cefotaxima
CAZ	Ceftazidima
TZP	Piperacilina-tazobactam
GM	Gentamicina
AK	Amikacina
CIP	Ciprofloxacino
TGC	Tigeciclina
CS	Colistina
Kb	Kilobases
CIM	Concentración Mínima Inhibitoria
PCR	Reacción en Cadena a la Polimerasa
<i>bla</i>	Nombre de los genes codificantes para β -lactamasas
AmpC	Serín- β -lactamasa
IND	Indeterminado
Cr	Cromosomal
NEG	Negativo
POS	Positivo

Introducción

La resistencia bacteriana a antibióticos se ha convertido en una de las crecientes preocupaciones en salud pública, debido a que en las últimas décadas el uso excesivo de antibióticos, ha seleccionado de manera sucesiva clones bacterianos con mecanismos de resistencia cada vez más potentes, dificultando el tratamiento de infecciones ocasionadas por microorganismos multirresistentes (1, 2). Adicionalmente, la baja disponibilidad de nuevas opciones terapéuticas, principalmente por los elevados costos de investigación, así como, por el constante desafío entre la creación de nuevas moléculas eficaces versus la propagación de determinantes de resistencia, ha agravado la problemática de resistencia antimicrobiana a nivel mundial (3). En consecuencia, las infecciones hospitalarias ocasionadas por bacterias resistentes, son una causa importante del aumento de la morbi-mortalidad en pacientes hospitalizados y constituyen una carga social y económica significativa tanto para el paciente como para el sistema de salud en general, debido principalmente a estancias hospitalarias más prolongadas y mayores riesgos de mortalidad (4-6).

En bacterias gram negativas, la producción de β -lactamasas es una de las causas más comunes de resistencia a antibióticos de tipo β -lactámicos, los cuales son una de las familias de fármacos de primera elección en la terapia antimicrobiana debido a su buena eficacia y seguridad, y también porque su actividad se puede ampliar o restablecer químicamente. Esta versatilidad y/o maleabilidad no la posee ninguna otra clase de antibiótico (7). Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se caracterizan por hidrolizar de manera eficiente antibióticos de tipo oximino- β -lactámicos; también se encuentran las carbapenemasas, determinantes de resistencia de gran importancia clínica debido a su amplio espectro de actividad antimicrobiana y resistencia a inhibidores (8, 9). Estas enzimas pueden conferir resistencia no sólo contra las oximino-cefalosporinas y cefamicinas sino también contra los carbapenémicos, pero no a aztreonam. En las infecciones ocasionadas por bacterias productoras de carbapenemasas generalmente se presentan fallas en la terapéutica antibiótica, así como un aumento en los costos en que incurren los pacientes que han recibido terapia antibiótica inapropiada (2, 10).

Así mismo, se han descrito diferentes sub-tipos de carbapenemasas, los más importantes respecto a su relevancia clínica y epidemiológica son: IMP (*Imipenem hydrolyzing β -lactamase*), VIM (*Verona Integron-encoded β -lactamase*), KPC (*K. pneumoniae Carbapenemase*), SPM (*Sao Paulo Metallo- β -lactamase*) y recientemente las de tipo NDM (*New Delhi Metallo- β -lactamase*), las otras metalo- β -lactamasas (11), SIM (*Seoul Imipenemase*), GIM (*German Imipenemase*), DIM (*Dutch Imipenemase*) tienen una menor tasa de difusión y un impacto clínico inferior (10).

La primera variante de NDM fue detectada en una cepa de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* aislada en un paciente que regresa a Suecia desde India en 2008 (12), país en donde NDM-1 se ha generalizado en la familia *Enterobacteriaceae* y donde se ha difundido a otros países del Reino Unido y Europa, Pakistán, países balcánicos, Australia, Hong Kong, Japón, Canadá, Estados Unidos, Guatemala, entre otros (13-23). Así mismo se ha logrado diseminar de manera eficiente en otras especies tales como: *Acinetobacter (baumannii* y *no baumannii*)(24), *Pseudomonas aeruginosa*(20), *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* (22), *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii* (25-27) entre otras. Esta diseminación dada principalmente por la transferencia horizontal del gen *bla_{NDM}* a través de plásmidos conjugativos, que en su mayoría son fácilmente transferidos y capacitados para un amplio reordenamiento, lo que sugiere una transmisión generalizada y plasticidad entre poblaciones bacterianas. Incluso, pueden co-transportar una variedad de determinantes de resistencia a diferentes clase de antibióticos tales como quinolonas, aminoglicosidos, genes de tipo 16S RNA metilasa, entre otros (26).

Del mismo modo, la amplia diseminación del gen *bla_{NDM}* no solo ha sido por la movilización en plataformas plasmídicas, sino también por su asociación corriente arriba con la secuencia de inserción *ISAba125* (encontrada completa y/o truncada) y característica del transposon 125 identificado en *Acinetobacter spp.* Asimismo, corriente abajo se ha identificado el gen *ble_{MBL}* (resistencia a bleomicina) y *trpF* (N-5'-phosphoribosyl transferase), los cuales sugieren que este tipo de secuencia de inserción haya empleado inicialmente un mecanismo de movilización "en bloque" y por ende la hipótesis de que la secuencia de inserción *ISAba125* pueda ser el origen de la diseminación entre plásmidos del grupo *Enterobacteriaceae* (26, 27).

Ahora bien, desde el primer reporte en Sur América de KPC-2 en *Klebsiella pneumoniae*, así como la evidencia de un brote intercontinental de *Klebsiella pneumoniae* con KPC-3 desde Israel; por consiguiente, se ha detectado un incremento en el número de aislamientos productores de KPC en Colombia (28). Este incremento de la prevalencia ha ocurrido simultáneamente con el aumento de los rangos de resistencia a carbapenémicos entre enterobacterias (hasta un 6%) (29); lo cual debido a estos hallazgos y con el fin de determinar el escenario de el incremento en la resistencia a antibioticos carbapenémicos y del continuo desafío mundial por la rápida diseminación de determinantes de resistencia, surge la necesidad de hacer seguimiento a este tipo de amenazas en salud pública y lograr determinar los factores de riesgo, así como los mecanismos de movilización de estas determinantes genéticas, lo cual permite disponer de información epidemiológica valiosa de la constante dinámica de diseminación de la resistencia bacteriana en hospitales de nuestro medio.

Es por lo tanto que el estudio de estos 6 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos y aislados en pacientes de una unidad neonatal, enmarcado en un sistema de vigilancia epidemiológica a nivel hospitalario, logró identificar por primera vez en nuestro país y Suramérica aislamientos portadores del gen *bla_{NDM-1}*. El propósito de este estudio fue determinar las características moleculares y genéticas en dichos aislamientos; así como, caracterizar las posibles estructuras de movilización responsables de la emergencia o diseminación de este gen en nuestro país. Tales hallazgos en comparación con lo previamente reportado a nivel mundial, permitirá establecer la relación epidemiológica con determinados clones o la emergencia de este gen a partir de aislamientos circulantes en nuestro entorno, lo cual permitirá contribuir a generar información sólida que pueda ser utilizada para establecer medidas de control y prevención ante este fenómeno de resistencia.

Antecedentes

En la década de los 80's y 90's, los antibióticos carbapenémicos fueron alguna vez considerados como “la última herramienta antimicrobiana” usados principalmente contra bacterias gram negativas productoras de enzimas de tipo BLEES y AmpC (7). Para esa época, solo algunas β -lactamasas podían inactivar los carbapenémicos, y en un muy corto tiempo, las carbapenemasas y en especial las metalo- β -lactamasas (11) fueron más frecuentes al punto en que hoy están ampliamente distribuidas en los 5 continentes (30). Este aumento ha sido relacionado al uso inadecuado de los antibióticos, lo cual incide en que una gran proporción de especies de *Pseudomonas spp.* y *Acinetobacter spp.* hayan desarrollado mutaciones que les confieren resistencia a carbapenémicos, y más aun a que especies de enterobacterias hayan adquirido estas determinantes de resistencia debido a su movilización por medio de plataformas genéticas móviles tales como los plásmidos (31)

Actualmente, el personal médico y de atención hospitalaria son conocedores de la existencia de bacterias gram negativas resistentes a carbapenémicos debido a la presencia de carbapenemasas, especialmente encontradas en especies de *Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, entre otras; lo cual ha incrementado los índices de morbilidad y mortalidad en los pacientes infectados por estos microorganismos (30). Las enzimas de tipo MBL también representan un reto a nivel clínico debido al alto espectro de actividad y su resistencia a inhibidores de β -lactamasas de tipo serina. Adicionalmente, estas determinantes genéticas se movilizan con otros genes que les confieren resistencia a otros grupos de antibióticos (ej. aminoglicósidos); constituyendo un reto para el tratamiento de las cepas portadoras, dado que presentan perfiles de resistencia contra la mayoría de antibióticos disponibles, incluyendo inhibidores de β -lactamasas, lo cual les confiere una connotación de tipo “pan-resistente”, permitiendo solo ser tratadas con colistina y tigeciclina. Sin embargo el uso del primero fue discontinuado desde la década de los 80 por su alto rango de toxicidad a nivel renal, y el segundo tiene un costo bastante elevado, dificultando aún más el tratamiento para este tipo de microorganismos (32).

Varios brotes de bacterias productoras de MBL han sido reportados en diferentes hospitales a nivel mundial, principalmente en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), Salas de Cirugía, UCI neonatales, Unidades de Transplante de órganos, entre otras. Estos brotes a menudo involucran varios departamentos y se pueden extender por varios meses y hasta años. Los análisis de PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) y tipificación molecular indican que la mayoría de los brotes son monoclonales en su origen, hecho que indica que los principales vehículos de diseminación de estos genes entre diferentes pacientes está dado principalmente por los trabajadores en el área de la salud (médicos, enfermeras, auxiliares, entre otros), así como pacientes colonizados o infectados. Bacterias productoras de MBL de baja virulencia y encontradas en el ambiente hospitalario (ej. *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas fluorescens*) pueden también constituir un reservorio para la diseminación nosocomial de genes tipo MBL. Fómites (ej. estetoscopios) han sido también implicados en la transmisión hospitalaria (4)

La mayoría de infecciones producidas por cepas productoras de MBL ocurren principalmente en pacientes con considerables co-morbilidades o en pacientes internados en UCI con antecedentes de cirugías. Los neonatos con bajo peso al nacer en UCI-neonatales también tienen un alto riesgo de infección. Igualmente se ha demostrado que hospitalizaciones prolongadas, quimioterapia neoplásica, corticosteroides, catéteres urinarios, administración/duración de antibióticos, dosis total de antibióticos administrados y dosis total de carbapenémicos son estadísticamente significativos para el desarrollo infecciones hospitalarias (33).

Así mismo, cepas productoras de MBL han sido implicadas en casos de neumonía nosocomial, neumonía asociada a ventiladores, bacteremias, sepsis, infecciones urinarias, infecciones intra-abdominales, infecciones de heridas quirúrgicas, abscesos cerebrales, entre otras (4). Estas cepas están asociadas con tasas de mortalidad desde un 25% hasta un 75%; un estudio canadiense encontró un incremento en el rango de mortalidad entre pacientes con infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* productora de MBL, comparado con pacientes con infecciones provocadas por *P. aeruginosa* no productora de MBL (25% vs. 13%; $P < 0.05$) (34).

Por otro lado, la metalo- β -lactamasa de tipo NDM-1 ha participado en la reciente crisis internacional resultante de la difusión de *Klebsiella pneumoniae* y otras enterobacterias resistentes a carbapenémicos (12-18, 21, 25, 35-38), principalmente por la relación

epidemiológica con el subcontinente Hindú; asociado primordialmente a infecciones a nivel hospitalario o de la comunidad, turismo médico, aguas urbanas contaminadas, movilización dada por plásmidos conjugativos, uso indiscriminado de antibióticos, falta de políticas en cuanto al control de infecciones e inadecuados sistemas de vigilancia epidemiológica, entre otras (13, 24, 39, 40). Lo anterior ha generado la necesidad de estudiar cómo ha sido la movilización y diseminación de esta determinante genética a nivel global, para contrarrestar el efecto de la emergencia de NDM en la problemática actual de resistencia antimicrobiana a nivel de salud pública.

NDM ha logrado diseminarse de manera exitosa en diferentes especies y de manera variada, ya que se ha reportado en diferentes tipos ST en especies *de E. coli* (ej. ST 101, ST 131, entre otros) y *K. pneumoniae* (ej. ST 11, ST 14, ST147, entre otros) (12-18, 21, 25, 37, 38), mostrando su diversidad clonal en diferentes localidades geográficas, incidiendo en su rápida y fácil diseminación. Lo anterior en gran medida por la movilización facilitada por diferentes tipos de plásmidos (IncA/C, IncF, IncL/M), muchos de estos con amplio espectro de hospedero y fácilmente auto-transferibles por medio de conjugación entre diferentes especies de gram negativos (4-11, 14, 18) incluyendo enterobacterias, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *V. cholerae*. A su vez co-transportan otros determinantes de resistencia (*bla_{TEM-1}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{OXA-10}* and *bla_{CMY}*, *qnrA*, *qnrB*, *armA*, *rmtA*, *rmtC*, entre otros) haciendo aún más importante la respuesta inmediata a la emergencia de esta nueva determinante de resistencia tanto a niveles locales como internacionales (41).

Todo esto nos lleva a inferir que pese al conocimiento sustancial con respecto a la biología molecular y genética de esta enzima, no solamente es necesario conocer las características genéticas y moleculares en aislamientos resistentes a carbapenémicos en Colombia; sino que también, es necesario profundizar en la caracterización de las plataformas de movilización que les permitió emerger o diseminarse de manera eficiente en nuestro entorno. De esta manera se logrará caracterizar mejor el fenómeno de diseminación de este mecanismo de resistencia, lo cual aportará información para el constante reto en el tratamiento de infecciones ocasionadas por este tipo de microorganismos, así como para lograr establecer mejores políticas de control de infecciones en los diferentes organismos de salud para hacer frente a esta suceso en salud pública.

Justificación

Los actuales estudios y reportes epidemiológicos destacan la adquisición bacteriana del potente arsenal en resistencia como lo es la carbapenemasa NDM, el cual representa una amenaza global por su alta eficacia en la hidrólisis de todos los antibióticos β -lactámicos (excepto aztreonam), incluyendo los carbapenémicos, que son utilizados como la última herramienta terapéutica cuando los otros antibióticos han fracasado. Por otro lado, a diferencia de los otros mecanismos de resistencia a carbapenémicos, NDM tiene la capacidad de diseminarse rápidamente entre diferentes especies de enterobacterias y otras especies de gran importancia clínica como *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, dado principalmente por la movilización entre diferentes plataformas genéticas y diferentes plásmidos conjugativos y de amplio hospedero, siendo un agravante más para la problemática de salud pública a nivel mundial. No obstante, tenemos que estar alertas y aumentar las medidas estrictas para el control en el uso apropiado de antibióticos, así como establecer redes de vigilancia epidemiológica a nivel local e internacional, que permitan contener en gran medida la tan acelerada diseminación de genes de resistencia (3-20, 24-27,30-32).

Cada vez son menos las opciones terapéuticas para el tratamiento de estos microorganismos altamente resistentes y cada vez más los reportes de microorganismos gram negativos que contienen genes de resistencia a carbapenémicos en diferentes sitios a nivel mundial, lo cual implica un aumento en los costos para el tratamiento infecciones por bacterias multirresistentes, involucrando estancias hospitalarias más prolongadas e incremento en las tasas de morbi-mortalidad en pacientes hospitalizados (30-32). Las bacterias gram negativas portadores de β -lactamasas son considerablemente prevalentes en Latino América, pero es limitado el conocimiento acerca de su prevalencia real en Colombia, lo cual sumado al incremento reciente de aislamientos resistentes a carbapenémicos y la incesante amenaza mundial por la rápida propagación de genes de resistencia a carbapenémicos genera la necesidad de determinar los principales mecanismos de diseminación y movilización en nuestro entorno, y así disponer de

información sólida para desarrollar de manera efectiva, estrictas políticas de seguridad y vigilancia epidemiológica para este tipo de microorganismos con tan relevante importancia en salud pública y clínica (2, 23).

De igual manera, en Colombia es escasa la información acerca del papel que desempeñan las plataformas genéticas en la adquisición, emergencia o diseminación de los genes de resistencia. Este estudio plantea así contribuir al conocimiento, no solo del entorno genético del gen bla NDM, sino también a la determinación de los mecanismos moleculares que permitieron su emergencia o diseminación en nuestro entorno; lo anterior frente a lo previamente reportado en otras áreas geográficas, nos permitirá indagar más al respecto de la estrecha relación de las principales plataformas de movilización y su asociación con clones de determinadas especies de importancia clínica circulantes a nivel mundial o la adquisición de determinantes de resistencia en cepas autóctonas. Este tipo de acercamiento nos permitirá tomar medidas de prevención y vigilancia epidemiológica a nivel local de la llegada de determinantes de resistencia de tan alto impacto epidemiológico, económico y clínico en nuestra actual problemática en salud pública.

Preguntas de investigación

¿Cuáles son los diferentes mecanismos moleculares y genéticos involucrados en la emergencia o diseminación del gen bla NDM en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* en una unidad neonatal hospitalaria de Bogotá?

¿Estos aislamientos y sus respectivas plataformas móviles están relacionadas o son similares a las reportadas previamente en otras áreas geográficas?

1. Objetivo general

Determinar las características genéticas y moleculares de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadores del gen *bla*_{NDM} causantes de infección en una unidad neonatal de un hospital de Bogotá, así como caracterizar las estructuras de movilización responsables de la emergencia y/o diseminación del gen *bla*_{NDM}.

1.1. Objetivos específicos

- ✓ Establecer las características moleculares y la relación genética de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae bla*_{NDM} positivos causantes de infección
- ✓ Determinar y caracterizar la localización del gen *bla*_{NDM} en sus posibles plataformas de movilización en los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* analizados.
- ✓ Establecer el entorno genético del gen *bla*_{NDM} responsable de su diseminación y expresión en los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* estudiados.

2. Marco conceptual

2.1. Antibióticos β -lactámicos

Esta familia de antibióticos se caracteriza químicamente por la presencia de un anillo β -lactámico, en los que su actividad antimicrobiana depende de la integridad de dicho anillo. Las penicilinas, cefalosporinas, carbapenemes y monobactámicos pertenecen a este tipo de antibióticos. (Figura 1). Se destaca dentro de este grupo de antibióticos las penicilinas. Ya que desde su descubrimiento en el siglo pasado, su amplio uso terapéutico y su producción a gran escala, hacen de éste uno de los eventos más significativos de la historia médica y de la industria farmacéutica (42, 43).

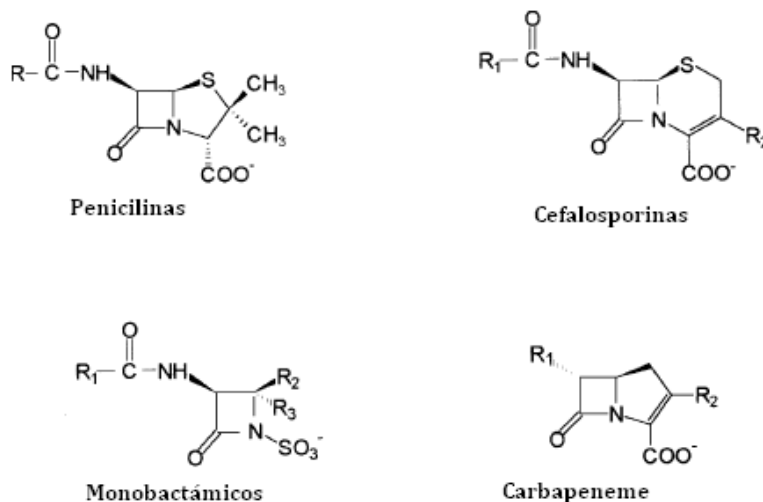


Figura 1. Estructura química de antibióticos β -lactámicos según su clasificación (Tomado de Matagne, *et al.* 1998).

Este grupo de antibióticos, contienen además del anillo β -lactámico, un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la

condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar al doble anillo característico. Además tienen una cadena lateral en la posición 6 del anillo β -lactámico que varía de unas penicilinas a otras y es la que define sus propiedades farmacológicas y farmacocinéticas (Figura 2) (43)

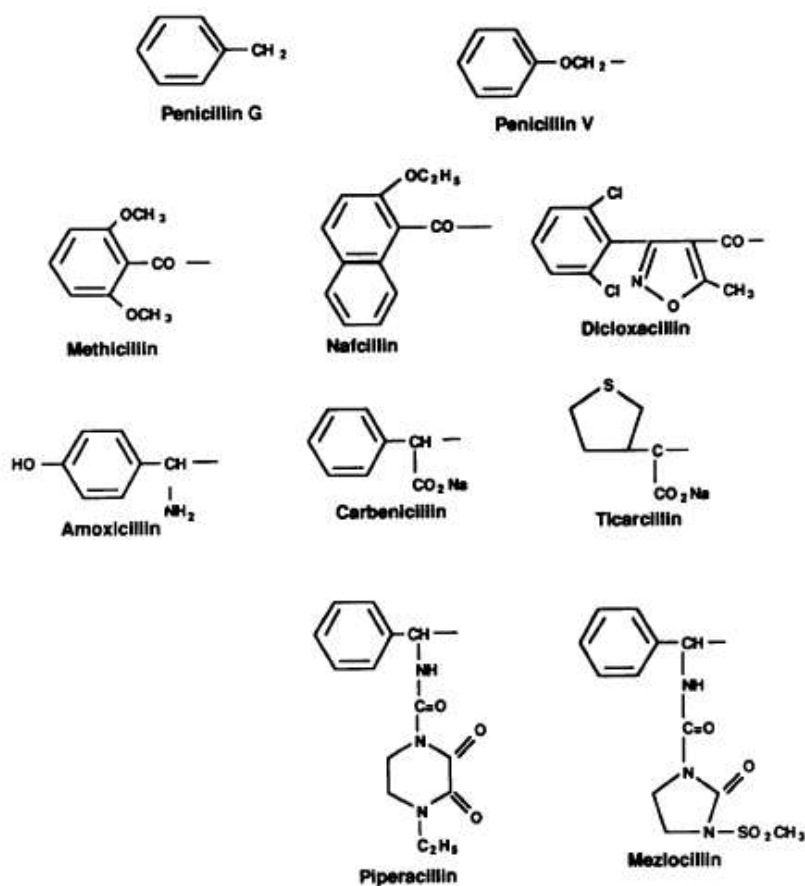


Figura 2. Cadenas laterales de las diferentes penicilinas. (Tomado de Bodey, 1990) (44)

Los antibióticos β -lactámicos actúan inhibiendo la síntesis de peptidoglicano, importante para la integridad estructural de la pared celular bacteriana. Los β -lactámicos son análogos estructurales de la D-alanil-D-alanina, aminoácidos del extremo terminal de las subunidades peptídicas precursoras del peptidoglicano. Dicha similitud, facilita la unión irreversible del anillo β -lactámico al sitio activo de las transpeptidasas conocidas como PBPs “penicillin binding proteins”, proteínas que permiten la unión entre las cadenas de peptidoglicanos paralelas. Su unión covalente con el antibiótico interrumpe así el proceso de síntesis de la pared celular, lo cual conlleva finalmente a la lisis celular (43)

Dentro de los β -lactámicos también se encuentran los carbapenémicos, que debido a su estructura les confiere un amplio espectro de actividad bactericida y la propiedad de ser altamente resistentes a las β -lactamasas (45). Esta clase de antibióticos fueron originalmente desarrollados a partir de un derivado natural producto del microorganismo *Streptomyces cattleya*, la tienamicina, químicamente inestable, por lo cual se desarrolló un derivado estable que conservaba las buenas características antibacterianas, la N-formimidoil tienamicina y/o Imipenem, posteriormente fueron desarrollados Meropenem, Ertapenem, Doripenem. Su mecanismo de acción radica en que inhiben la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación, uniéndose a residuos de serina de peptidasas situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática denominadas PBP, debilitando la pared celular y desencadenando la lisis bacteriana (46).

El anillo carbapenem es un azobicyclo formado por la condensación de un anillo β -lactámico y otro pirrolidínico de 5 miembros e insaturado. Posee en posición 1 un átomo de carbono (carba) y un enlace no saturado entre 2 y 3 (-em). Todos tienen en posición 6 un grupo hidroxietilo en configuración trans que protege al anillo β -lactámico de muchas serino- β -lactamasas y en posición 3 un radical carboxilo, importante para que el anillo pirrolidínico active al β -lactámico. Los distintos carbapenems difieren por sustituciones en las posiciones 1 y 2 (46)(Figura 3)

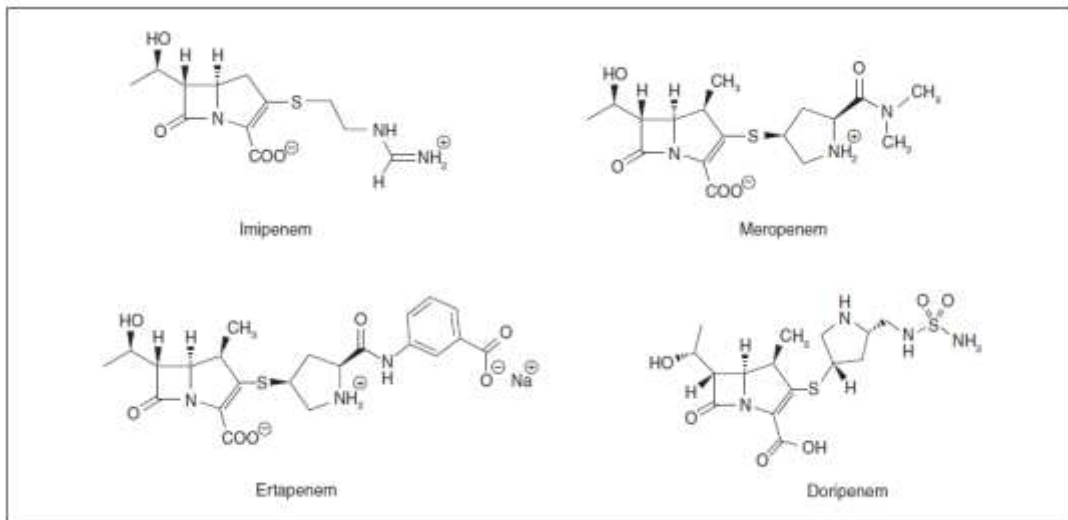


Figura 3. Estructuras químicas de los principales carbapenems (Tomado de Martínez, et al., 2010)

2.2. Mecanismos de resistencia a β -lactámicos

La aparición de resistencia a antibióticos β -lactámicos comenzó incluso antes de que se desarrollara el primer β -lactámico, la penicilina. La primera β -lactamasa fue identificada en *Escherichia coli*, antes de la liberación de la penicilina para su utilización en la práctica médica (47). Actualmente, la resistencia a los antibióticos β -lactámicos es uno de los principales problemas a nivel hospitalario en el mundo, demostrando el éxito y la rapidez de adaptación de las bacterias a su entorno, que a su vez, puede ser natural y/o intrínseca de la bacteria. Esta se puede adquirir en las diferentes bacterias a través de procesos evolutivos por la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos y/o por la adquisición de genes de resistencia movilizados por diferentes plataformas genéticas. (2)

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para evadir del efecto deletéreo de este tipo de antibióticos, bien sea por alteración del sitio blanco, por reducción de la concentración intracelular del antibiótico ya sea por la disminución en la expresión de porinas o la sobre-expresión de bombas de eflujo, y la más importante, por la producción de β -lactamasas. Dicha producción se ha atribuido principalmente al amplio uso de β -lactámicos lo cual ha favorecido la selección, emergencia y distribución de bacterias resistentes. (8)

2.2.1. β -lactamasas

La biosíntesis de estas enzimas es uno de los mecanismos más eficientemente desarrollados por las bacterias en cuanto a resistencia antimicrobiana, ya que hidrolizan irreversiblemente el anillo β -lactámico, haciendo nula la actividad del antibiótico sobre la célula bacteriana. Estas enzimas se han encontrado en la mayoría de las especies bacterianas y a su vez, presentan una gran diversidad entre sí (2)

En la clasificación establecida por Ambler, las β -lactamasas se han agrupado en cuatro diferentes clases (A,B,C y D) con base a su secuencia de aminoácidos, siendo las clases A y C las más prevalentes en las bacterias, y las menos abundantes las del grupo B, es decir las metalo β -lactamasas (11). En 1995 Bush y colaboradores, proponen una clasificación funcional de acuerdo con los sustratos y/o antibióticos sobre los que actúan y considerando la susceptibilidad que presentan frente a inhibidores (*Tabla 1*) (48)

GRUPO	TIPO DE ENZIMA	CLASE MOLECULAR (11)	ENZIMA REPRESENTATIVA
1	Cefalosporinasa	C	AmpC cromosomal
2a	Penicilinasas	A	LEN-1
2b	Amplio espectro	A	TEM-1, SHV-1
2be	Espectro extendido	A	CTX-M, PER
2br	Resistente a inhibidores	A	TEM-30
2c	Carbencilinasas	A	PSE-1
2d	Cloxacilinasas	D o A	OXA-1
2e	Cefalosporinasa	A	Cefalosporinasas de <i>P. vulgaris</i>
2f	Carbapenemasa	A	Sme-1
3	Metaloenzima	B	VIM
4	Penicilinasas	-	LCR-1

Tabla 1. Clasificación funcional de β -lactamasas (Bush, *et al.*, 1995)

- *Grupo 1*: Enzimas que no son eficientemente inhibidas por el ácido clavulánico
- *Grupo 2*: Enzimas tipo penicilinasas, enzimas de espectro ampliado, B-lactamasas de espectro extendido (BLEE) inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam.
- *Grupo 3*: Enzimas de tipo metalo- β -lactamasas, débilmente inhibidas por los diferentes inhibidores de β -lactamasas e inhibidas por EDTA.
- *Grupo 4*: Otras penicilinasas que no son inhibidas por ácido clavulánico.

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son importantes en la resistencia a antibióticos β -lactámicos, ya que son capaces de hidrolizar las oximino-cefalosporinas y aztreonam, pero no hidrolizan las β -lactamasas-7- α sustituidas como el ceftioxitán. Son inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam y los genes que las codifican se encuentran en plásmidos fácilmente transferibles entre la población bacteriana ((2)).

En la actualidad, las BLEE conforman un grupo de enzimas muy diverso y se encuentran más frecuentemente en *E. coli* y *K. pneumoniae*, sin embargo, también se han encontrado en *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, y otros géneros de *Enterobacteriaceae*. Dentro de estas enzimas, se destacan las clases TEM, SHV, CTX-M, OXA, PER, entre otras. (2, 10)

2.3. Carbapenemasas

Representan la familia de enzimas más versátiles de las β -lactamasas, con un amplio espectro y sin precedente alguno por otro tipo de enzimas que hidrolicen los antibióticos β -lactámicos, muchas de estas enzimas reconocen casi todos los antibióticos β -lactámicos que se puedan hidrolizar, y la mayoría son resistentes contra la inhibición por los comerciales inhibidores de β -lactamasas (9)

Las carbapenemasas pertenecen a 2 grandes familias moleculares, distinguidas por su mecanismo hidrolítico sobre el sitio activo, las primeras carbapenemasas descritas fueron en bacilos gram positivos. A diferencia de otras β -lactamasas conocidas en esa época, estas enzimas eran inhibidas por EDTA, por lo tanto se establecieron como metalo- β -lactamasas. Posteriormente, se demostró que todas la metalo-carbapenemasas contenían al menos un átomo de zinc en el sitio activo que sirve como facilitador de la hidrólisis del anillo bi-cíclico β -lactámico. A mediados de la década de los 80, otro grupo de carbapenemasas emergieron entre los *Enterobacteriaceae*, pero su actividad no se veía afectada por el EDTA. Posterior a ello se demostró que estas enzimas utilizaban la serina en su sitio activo y eran inactivadas por inhibidores de β -lactamasas tales como Acido clavulánico y Tazobactam (49).

Solo hasta la década del 90, todas las carbapenemasas fueron descritas como especie-especificas, β -lactamasas codificadas cromosomalmente, con sus respectivas características bien definidas. Sin embargo dado el hallazgo de enzimas carbapenemasas en plásmidos conjugativos en diferentes especies bacterianas gram negativas, cambió los modelos de diseminación de carbapenemasas hasta ese entonces conocidos, ya que lo que una vez fue considerado como problema de brotes clonales, ahora se ha convertido en un problema global de diseminación entre especies bacterianas (9)

La clasificación funcional de este tipo de enzimas obedece a principalmente en grupos 2f y 3, lo anterior asignado según diferenciación con respecto a la especificidad en los sustratos o por perfiles de inhibidores. Las clases moleculares A, C y D, incluyen β -lactamasas con serina en sus sitios activos, donde la clase molecular B se encuentran las metalo- β -lactamasas con sitio activo por Zinc. A continuación la clasificación de las diferentes clases moleculares de estas enzimas (9, 49):

- Carbapenemasas clase A está dividida en 5 grupos filogenéticos: GES, KPC, SME, IMI y NMC-A, en donde el grupo que en los últimos años ha tomado relevancia clínica han sido los tipo KPC y tomando dominancia sobre el resto de enzimas de este grupo. A la fecha, la movilización de este gen se ha dado básicamente por la combinación de la transferencia horizontal plasmídica con la presencia de Tn4401.
- Carbapenemasas tipo OXA u oxacilinasas, también conocidas como clase D β -lactamasas, frecuentemente encontradas en especies de *Acinetobacter* de manera clonal, aunque hay un incremento gradual en otras especies *Enterobacteriaceae*, particularmente en *K. pneumoniae* dada principalmente por la transferencia vertical vía plásmidos.
- Metalo- β -lactamasas o de clase B, son las carbapenemasas con mayor diversidad molecular y mayor dificultad terapéutica. El sitio activo contiene dos iones de zinc que de manera única le permite atacar e hidrolizar los antibióticos β -lactámicos, escapando de manera eficiente la acción de los inhibidores de β -lactamasas. En este grupo se destaca IMP, VIM, SPM y recientemente NDM.

2.3.1. Metallo- β -lactamasas

Esta clase de enzimas se caracteriza principalmente por la habilidosa capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (excepto Aztreonam), así como por su resistencia a inhibidores de β -lactamasas y susceptibilidad por iones metálicos quelantes (EDTA). Estas enzimas al igual que todas las β -lactamasas, se pueden dividir en aquellas que normalmente son mediadas por el cromosoma y aquellas que son transferidas por plásmidos, sin embargo recientemente nuevos tipos transferibles de MBLs se han diseminado de manera rápida y eficiente entre especies de *P. aeruginosa* y *Enterobacteriaceae*, y un nuevo escenario clínico se ha establecido con la diseminación

global de β -lactamasas de espectro extendido (BLEES). A nivel molecular, este grupo de enzimas han hecho casi que imposible su clasificación y estandarización de acuerdo a sus estructuras (32).

Algunas bacterias, usualmente de ambientes naturales, poseen MBLs de manera intrínseca, probablemente porque estas bacterias estuvieron expuestas a componentes β -lactámicos, lo cual les permitió adquirir y mantener estos genes y sus productos. Pese a ello, un gran número de estos genes tipo MBLs son inducibles, y en su mayoría estas bacterias pueden ser altamente resistente a β -lactámicos, afortunadamente estos microorganismos son considerados patógenos oportunistas, con la excepción de *S. maltophilia* y *B. anthracis* que puedan llegar a causar procesos infecciosos. Estos genes cromosomales tipo MBLs de especies particulares varían muy poco unos entre otros, y también están co-regulados por β -lactamasas tipo serina. Entre este tipo de enzimas se destacan: BCII, IND, TUS, CphA, L1a, entre otras. (32)

La diseminación de genes MBLs está dada por el consumo desmesurado de cefalosporinas de amplio espectro y carbapenemasas. La mayoría pero no todas, se encuentran asociados en cassettes de resistencia de Integrones clase 1 o 3 (VIM, IMP), otros se han asociado con islas de patogenicidad integrados en mega plásmidos, caso de *bla*_{SPM-1} en *Salmonella entérica* serovar Typhimurium. Particularmente VIM-2 se ha mostrado bastante dominante y ampliamente diseminada en diferentes continentes por su asociación con Integrones de clase 1. Caso contrario, clones de *P. aeruginosa* portadores de SPM-1 no forma parte de un integrón sino que está asociado con regiones comunes que contienen nuevos tipos de estructuras de transposición con potencial de recombinasa y secuencias promotoras (9, 32, 49) (Figura 4)



Figura 4. Representación global de las enzimas tipo MBLs móviles. (Tomado de Walsh, et al., 2010)

2.3.2. Enzimas tipo NDM

La enzima New Delhi Metalo β -lactamasa (12) es la más reciente β -lactamasa clase B descubierta desde 2008 y reportada a nivel mundial mayormente en bacterias aisladas de pacientes con estrecha relación epidemiológica con India y algunos países del medio oriente. Actualmente presenta uno de los más grandes retos para el personal médico, hospitalaria y de la comunidad, debido a su fenotipo de resistencia a casi todos los antibióticos β -lactámicos, excepto aztreonam. Esta enzima se ha detectado en especies de la familia *Enterobacteriaceae*, así como en especies no fermentadoras y *Vibrionaceae*. Esta diseminación predominantemente involucra transferencia horizontal del gen *bla*_{NDM} entre plásmidos de amplio rango de hospedero y/o por brotes clonales (41). Así mismo la diseminación de este gen con otros genes de resistencia a diferentes grupos de antibióticos como macrolidos, aminoglicósidos, rifampicina, sulfamethoxazol y aztreonam se ha reportado, haciendo el panorama cada vez más alarmante. A diferencia de otras enzimas como KPC y OXA-48, aislamientos portadores del gen *bla*_{NDM} presentan altas concentraciones mínimas inhibitorias a carbapenémicos (13, 15-18, 35, 37)

Desde Agosto de 2010 se ha reportado bacterias con la enzima NDM a nivel mundial, y recientemente en un aislamiento de *K. pneumoniae* en Guatemala (38). Recientes hallazgos sugieren que los países balcánicos y del medio oriente pueden estar actuando como segundos reservorios en el brote de NDM-1, que probablemente pudo adquirir dicho gen desde el país de la India. (41)(Figura 5)

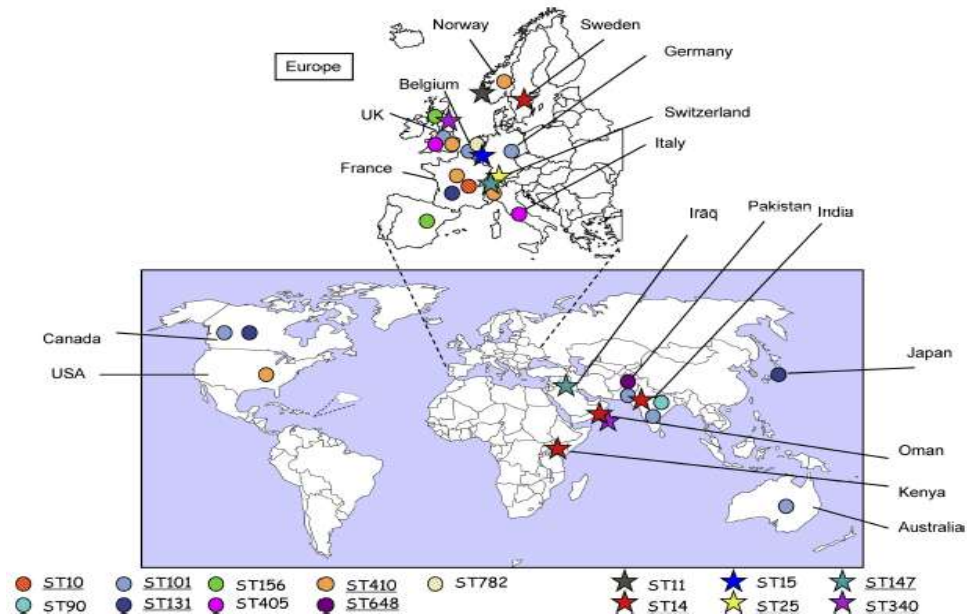


Figura 5. Distribución mundial de NDM-1 en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae*. (Tomado de Poirer, et al., 2011)

Aislamientos clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* con NDM-1 pertenecen a un gran número de tipos de secuencia (ST), aunque varios aislamientos de *E. coli* ST101 han sido recuperados en el Reino Unido, Pakistán y Canadá, lo que indica la asociación con el país de origen (India). La enzima NDM-1 también se ha reportado en aislamientos de *E. coli* ST131, lo anterior alarmante y bastante significativo debido a que este clon está estrechamente relacionado con la diseminación de CTX-M-15 a nivel mundial (50, 51)

Así mismo este gen se ha descrito en diferentes tipos de plásmidos (IncA/C, IncF, Inc L/M) y aún más inusual integrado al cromosoma (5, 13, 21). Muchos de estos plásmidos tienen la capacidad de ser auto-transferibles por medio de la conjugación bacteriana, así como un amplio rango de hospederos entre especies gram negativas incluyendo *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Vibrionaceae* (13, 14, 16-18, 37, 41). La mayoría de los plásmidos portadores del gen *bla*_{NDM} transportan otros determinantes de resistencia, incluyendo *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-10} y *bla*_{CMY} (que codifican para varias β-lactamasas); *qnrA6* y *qnrB1* (resistencia a quinolonas); *armA*, *rmtA* y *rmtC* (16S RNA methylasa: resistencia aminoglicósidos) (36); *arr-2* (resistencia a rifampicina); *sul-2* (resistencia a sulfonamidas); *cmIA* (resistencia a cloranfenicol); and *ereC* (resistencia a macrolidos).(41).

En la figura 6 se muestra un esquema de los principales hallazgos genéticos en especies de Enterobacterias con la presencia este gen, lo cual se observa la estrecha asociación con la secuencia de inserción IS*Aba125*, y como ésta puede estar total o parcialmente truncada por otros genes, de igual forma esta secuencia de inserción es frecuentemente detectada en especies de *A. baumannii*, asociada a la expresión de otros genes de resistencia en esta especie; de igual forma corriente abajo se detecta otro gen de resistencia a bleomicina (*ble*_{MBL}), lo cual sugiere que IS*Aba125* haya empleado inicialmente un mecanismo de movilización “en bloque” y por ende la hipótesis de que la secuencia de inserción IS*Aba125* pueda ser el origen de la diseminación entre plásmidos del grupo *Enterobacteriaceae* (26, 27). La mayoría de genes transferibles de otras metalo-β-lactamasas (*bla*_{VIM}- *bla*_{IMP}) son localizados en genes en cassette insertados en integrones de clase 1, pero este no es el caso para *bla*_{NDM}, sugiriendo que su origen difieren en gran medida de estas enzimas tipo VIM – IMP (32)

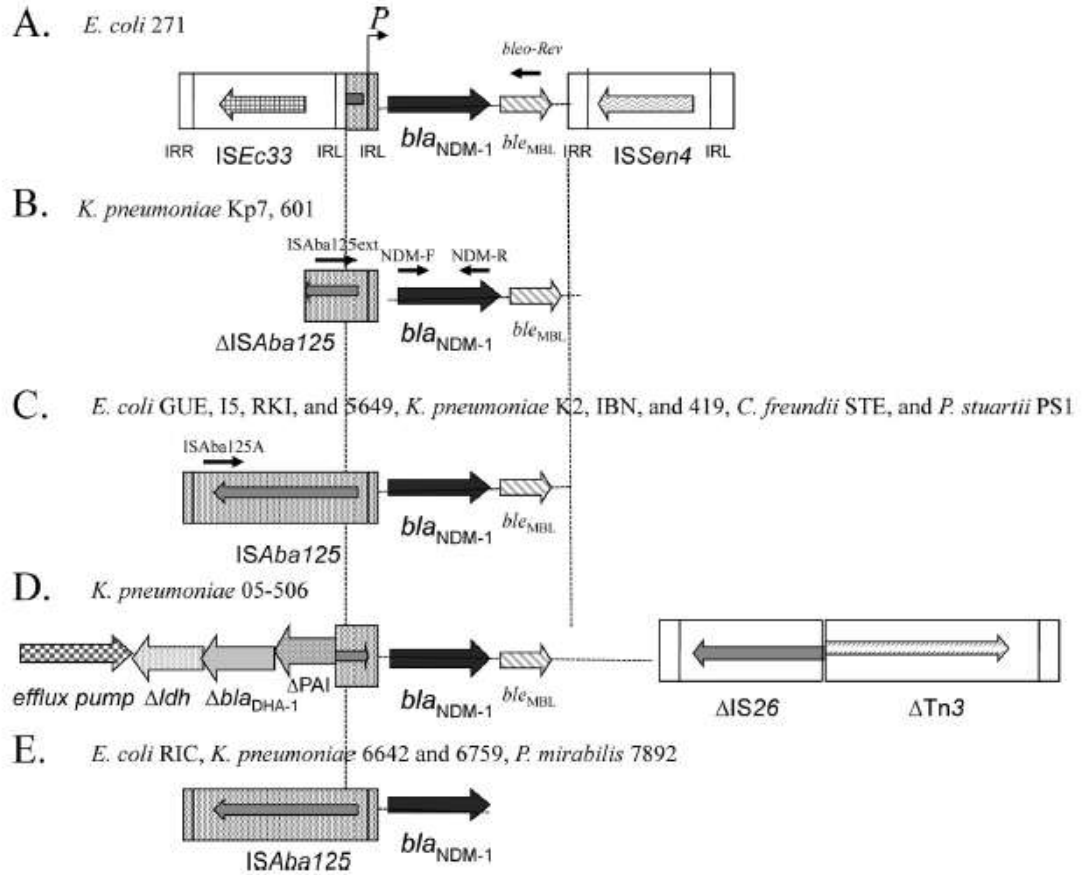
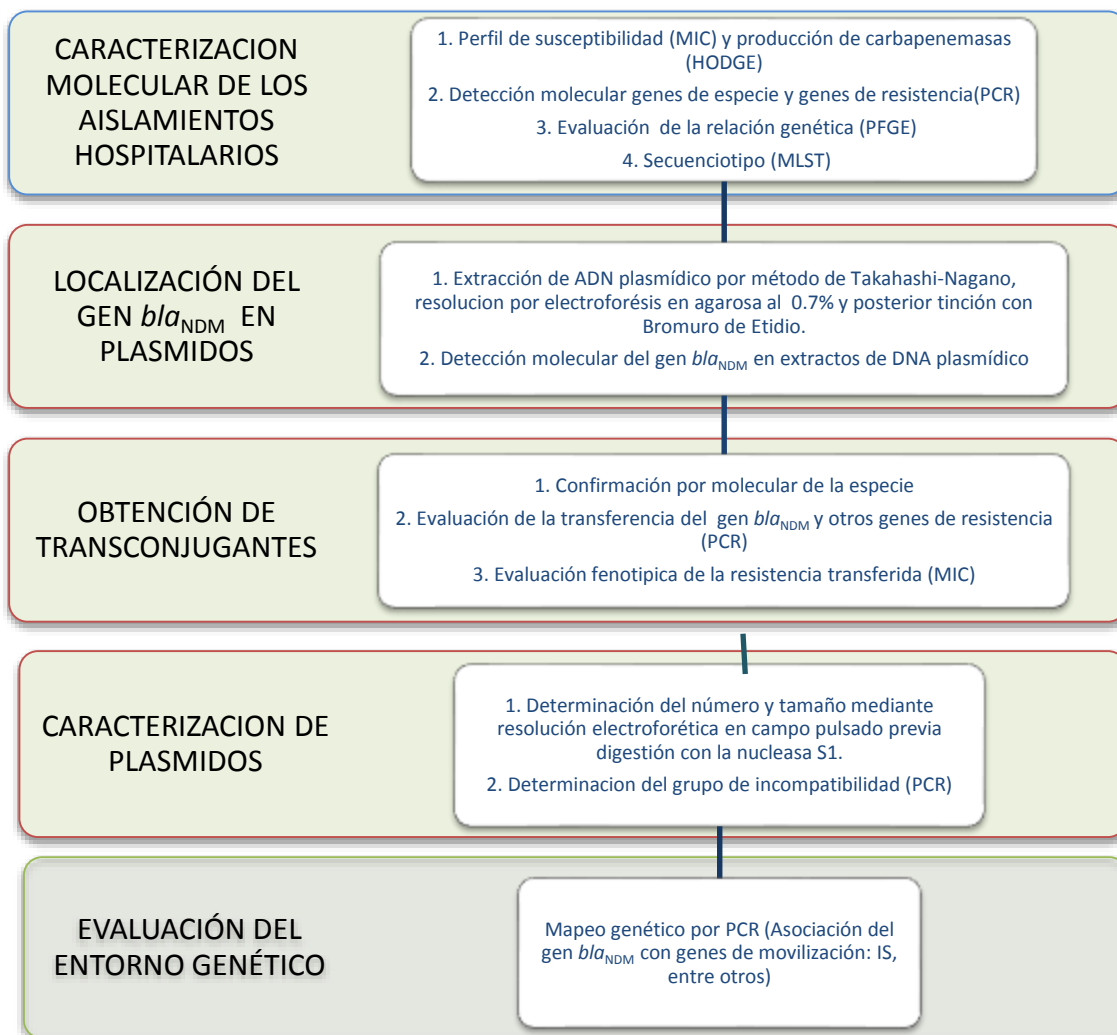


Figura 6. Esquema de las estructuras que rodean el gen *bla*_{NDM} en algunos aislamientos reportados de la familia *Enterobacteriaceae* (Tomado de Poirel, et al., 2011)

3. Materiales y métodos

3.1. Diseño experimental



3.2. Tipo de estudio

Estudio descriptivo de tipo retrospectivo en donde se caracterizaron genética y molecularmente aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadores del gen *bla*_{NDM} causantes de infección en una unidad neonatal de un hospital de Bogotá correspondiente a un período entre agosto de 2011 a enero de 2012.

3.3. Aislamientos bacterianos y cepas control

En el estudio se emplearon como material biológico 6 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes que fueron aislados de muestras de pacientes con infección hospitalaria y correspondientes a un brote en una unidad neonatal, que fueron seleccionados por su perfil de resistencia antimicrobiana a carbapenémicos (y otros antibióticos beta-lactámicos) y susceptibilidad a monobactámicos (aztreonam) empleando el sistema automatizado *MicroScan WalkAway® plus system* (Dade Behring, California). Actualmente se encuentran criopreservados y haciendo parte del cepario del Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad el Bosque.

En los ensayos de susceptibilidad a antibióticos y caracterización molecular de la resistencia, se utilizaron como controles las cepas *E. coli* ATCC 25922 (Cepa sensible a beta-lactámicos), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Productora de beta-lactamasa tipo SHV-18), *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-2146 (productora de carbapenemasa tipo NDM-1) y aislamientos de diferentes especies *Enterobacteriaceae* de referencia del Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana y de uso rutinario para la determinación de cada uno de los genes de resistencia evaluados.

Para los ensayos de conjugación se evaluaron las cepas receptoras *Escherichia coli* J53-2 (Rif^r), *Escherichia coli* J53-2AZ (Az^r), *Escherichia coli* CAG 12177 (Nal^r/ Te^r).

Para la caracterización de los perfiles plasmídicos se emplearon las cepas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, portadora de 2 plásmidos de tamaño 80 y 160 Kb, respectivamente (52); *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-2146, portadora de 4 plásmidos de 2, 85, 117 y 140 Kb (53).; así como, *Staphylococcus aureus* NCTC 8325, empleado para la normalización de la PFGE.

3.4. Caracterización molecular y genética de los aislamientos hospitalarios

3.4.1. Susceptibilidad a antibióticos

La susceptibilidad en los aislamientos hospitalarios se confirmó mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) por medio de dilución en agar a meropenem, cefotaxima, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, amikacina, gentamicina, ciprofloxacina, tigeciclina y colistina; por el método de E-test se confirmó la susceptibilidad a imipenem, ertapenem y aztreonam. La producción de carbapenemasas se determinó mediante el test de Hodge modificado y los resultados de susceptibilidad se interpretaron de acuerdo a los parámetros establecidos por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, CLSI 2013 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (54). Los resultados de susceptibilidad a tigeciclina y colistina fueron interpretados de acuerdo a los puntos de corte del Comité Europeo en Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana, EUCAST 2013 (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) puntos de corte disponible en http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.

3.4.2. Detección molecular de genes de resistencia a antibióticos

La determinación molecular en los aislamientos hospitalarios incluyó la detección por medio de la técnica de Reacción en Cadena a la Polimerasa (PCR) del gen *Khe* para la confirmación de especie (55), así como la detección de los siguientes genes que codifican la resistencia a antibióticos β -lactámicos: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} (56, 57). También se detectaron los genes relacionados a resistencia a fluoroquinolonas tales como: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, y a aminoglicósidos: *aac* (6')-Ib-cr, así como los genes que codifican para Cefalosporinasas de tipo plasmídico tales como: ACC, FOX, MOX, EBC, DHA y CIT. Por otra parte, debido al papel fundamental que tienen los Integrones como plataformas de movilización de genes de resistencia, se evaluó la presencia de los genes *intl1* e *intl2* como marcadores moleculares de los integrones clase 1 y clase 2, respectivamente. Adicionalmente, se evaluó la presencia del gen *sul1*, como marcador de la región 3' conservada de los integrones clase 1 con estructura clásica. Así mismo, se amplificó y secuenció la región variable de estos integrones, con el fin de identificar los genes en casete transportados de acuerdo a las condiciones previamente reportadas (58, 59).

El ADN molde se obtuvo a partir de extracción por el método de fenol/cloroformo y posterior precipitación en etanol absoluto, lo anterior de acuerdo a las condiciones ya estandarizadas en el Lab. de Genética Molecular Bacteriana de la Univ. El Bosque. Los iniciadores utilizados para la detección de genes de resistencia a antibióticos se encuentran descritos en la tabla 2, y se amplificaron de acuerdo a las condiciones reportadas para cada uno de los genes evaluados. De igual manera, los productos de amplificación obtenidos se observaron y analizaron en geles de agarosa del 1% en buffer TBE 0.5X a 8 V/cm, teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/mL); se utilizó como referencia de tamaños, el marcador de peso molecular DNA de 50 y 100pb ladder de Fermentas®.

PRIMER	SECUENCIA 5' - 3'	GEN	REFERENCIA
GN230	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	<i>ampC- FOX</i>	Pérez, et al., 2012
GN231	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG		
GN232	TCGGTAAAGCCGATGTTGCCGG	<i>ampC- EBC</i>	Pérez, et al., 2012
GN233	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT		
GN234	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	<i>ampC- ACC</i>	Pérez, et al., 2012
GN235	TTCGCCGAATCATCCCTAGC		
GN236	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	<i>ampC- DHA</i>	Pérez, et al., 2012
GN237	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
GN238	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	<i>ampC- CIT</i>	Pérez, et al., 2012
GN239	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC		
GN240	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	<i>ampC- MOX</i>	Pérez, et al., 2012
GN241	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		
GN260	CGTGCCGTGATCGAAATCCAG	<i>int1</i>	Márquez, et al., 2008
GN261	TTCGTGCCTTCATCCGTTTCC		
GN262	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	<i>int2</i>	Márquez, et al., 2008
GN263	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG		
GN288	ACTAAGCTTGCCCTTCCGC	<i>sul1</i>	Márquez, et al., 2008
GN289	CTAGGCATGATCTAACCTCG		
GN306	GTTTGATGTTATGGAGCAGCAACG	5'-CS	Márquez, et al., 2008
GN321	GCAAAAAGGCAGCAATTATGAGCC		
GN300	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	<i>qnrA</i>	Robicsek, et al., 2006
GN301	GATCGGCAAAGTTAGGTCA		
GN302	GATCGTAAAAGCCAGAAAGG	<i>qnrB</i>	Robicsek, et al., 2006
GN303	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
GN304	ACGACATTCGTCAACTGCAA	<i>qnrS</i>	Robicsek, et al., 2006
GN305	TAAATTGGCACCTGTAGGC		
GN307	ATGCGTTATATTCGCTGTG	<i>bla_{SHV}</i>	Monstein, et al., 2007
GN308	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA		
GN309	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA	<i>bla_{TEM}</i>	Monstein, et al., 2007
GN310	ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT		
GN311	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	<i>bla_{CTX-M}</i>	Monstein, et al., 2007
GN312	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG		

PRIMER	SECUENCIA 5' - 3'	GEN	REFERENCIA
GN331	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	Chi, <i>et al.</i> , 2006
GN332	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT		
GN436	TCGCTAAACTCGAACAGG	<i>bla</i> _{KPC}	Monteiro, <i>et al.</i> , 2012
GN437	TTACTGCCC GTTGACGCCAATCC		
GN438	TTGGCCTTGCTGCCTTG	<i>bla</i> _{NDM}	Monteiro, <i>et al.</i> , 2012
GN439	ACACCAGTGACAATATCACCG		
GN440	CTATTACTGGCAGGGATCG	<i>bla</i> _{GES}	Monteiro, <i>et al.</i> , 2012
GN441	CCTCTCAATGGTGTGGGT		
GN442	TGTTTTTGGTGGCATCGAT	<i>bla</i> _{OXA-48}	Monteiro, <i>et al.</i> , 2012
GN443	GTAAMRATGCTTGGTTCGC		
GN444	GAGTGGCTTAATTCTCRATC	<i>bla</i> _{IMP}	Monteiro, <i>et al.</i> , 2012
GN445	AACTAYCCAATAYRTAAC		
GN446	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	<i>bla</i> _{VIM}	Monteiro, <i>et al.</i> , 2012
GN447	AATGCGCAGCACCAGGATAG		

Tabla 2. Iniciadores empleados para la detección de genes de resistencia a diferentes antibióticos

3.4.3. Evaluación de la relación genética entre los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadores del gen *bla*_{NDM}

La relación genética de los 6 aislamientos hospitalarios se determinó mediante restricción del DNA genómico total con la enzima *Xba*I y su posterior separación por medio de Electroforesis en Campo Pulsado (CHEF-DR®III-BioRad Laboratories), de acuerdo a las condiciones descritas para *Klebsiella pneumoniae* (60)

A su vez se empleó la tipificación de secuencias de múltiples locus (Multilocus Sequence Typing- MLST) mediante la detección por PCR de los genes *rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB* y *tonB*, de acuerdo a los parámetros descritos por Diancourt y colaboradores (61). Los productos obtenidos fueron evaluados por electroforesis y posteriormente secuenciados (ambas cadenas) por el Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular – SSiGMol, de la Universidad Nacional de Colombia (Analizador Genético ABI3500). A las secuencias obtenidas de cada uno de los 7 genes evaluados se les determinó el alelo y por consiguiente, el tipo de secuencia (ST) mediante la combinación alélica en la página web (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>).

3.5. Detección y caracterización de las posibles plataformas de movilización del gen *bla*_{NDM}

Para lograr evidenciar la posible movilización del gen *bla*_{NDM} en plásmidos de tipo conjugativos, se procedió a realizar la evaluación de la susceptibilidad a ácido nalidíxico (32 µg/mL), rifampicina (100 µg/mL), tetraciclina (50 µg/mL) y azida de sodio (100 µg/mL) en los aislamientos hospitalarios y de esta forma determinar la cepa receptora apropiada para el ensayo de conjugación de plásmidos.

Para la obtención de transconjugantes se utilizó el procedimiento descrito por Schelesinger (62). Partiendo de cultivos axénicos no superiores a 24h de crecimiento en agar LB de cada uno de los aislamientos hospitalarios y de la cepa receptora seleccionada, se tomó 1 colonia de cada uno de los aislamientos, se mezclaron y dispersaron con la ayuda de un asa en una área de 4 cm² en agar BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. La selección se realizó por medio de repique en agotamiento del crecimiento en “césped obtenido” en placas de agar Mac Conkey suplementado con ceftazidima 5 µg/mL - Azida de Sodio (100 µg/mL) o tetraciclina (50 µg/mL) e incubadas a 37°C por 24 horas. Las colonias transconjugantes con crecimiento y morfología de *E. coli* fueron nuevamente repicadas en agar Mac Conkey suplementado con ceftazidima 10 µg/mL - Azida de Sodio 100 µg/mL o tetraciclina (50 µg/mL).

Así mismo, se realizó tanto la confirmación a nivel molecular de la especie en las transconjugantes obtenidas mediante la detección del gen *uidA* gen específico para *E. coli*, así como, la evaluación de la resistencia transferida de manera fenotípica y genotípica de acuerdo a lo previamente descrito.

De igual manera, la determinación de la localización del gen *bla*_{NDM} en las posibles plataformas de movilización, fue extraído el ADN plasmídico mediante el procedimiento descrito por Takahashi y Nagano (63), en el cual se parte de crecimiento bacteriano en caldo LB suplementado con ceftazidima (30 µg/mL), en donde las células fueron lisadas en solución detergente alcalina (SDS- NaOH), seguido de una neutralización con una solución de acetato de sodio 3M (pH 5.5), luego extracción con 1 volumen de Fenol: Cloroformo y posterior precipitación y purificación del DNA plasmídico con acetato de sodio 1M y etanol absoluto, respectivamente. Los plásmidos obtenidos se resolvieron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.7 % a 5 V/cm y se observaron tras su tinción con bromuro de Etidio 0.5 µg/mL por 30 minutos. También, se hizo la

detección molecular del gen *bla_{NDM}* en los extractos obtenidos empleando los primers específicos, previamente mencionados; así como, la detección del grupo de incompatibilidad tanto en los aislamientos hospitalarios como de las respectivas transconjugantes, mediante la técnica de tipificación por PCR descrita por Carattoli y colaboradores (64).

Posteriormente, se estableció el número y tamaño de los plásmidos mediante la técnica descrita por Barton y colaboradores, a partir de digestión de DNA genómico en geles de agarosa con 1 unidad de nucleasa S1 (Invitrogen) a 37 °C durante 1 hora (65). Los plásmidos en forma lineal se separaron mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE), y la estimación de sus pesos moleculares se realizó utilizando como marcador de peso molecular los plásmidos de las cepas de referencia (ATCC BAA 2146 Y ATCC 700603), así como se utilizó la cepa de *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 digerida con *Sma*I a temperatura ambiente, lo anterior con el fin de normalizar la PFGE. Las condiciones de corrido fueron las siguientes: 6 V/cm- 120°- 14°C, pulsos de 2.2 y 54.2 segundos por 19 horas.

3.6. Evaluación del entorno genético del gen *bla_{NDM}*

La asociación de los elementos genéticos y su posición con respecto al gen *bla_{NDM}*, se determinó mediante la estrategia de “mapeo por PCR” y representada en la figura 7

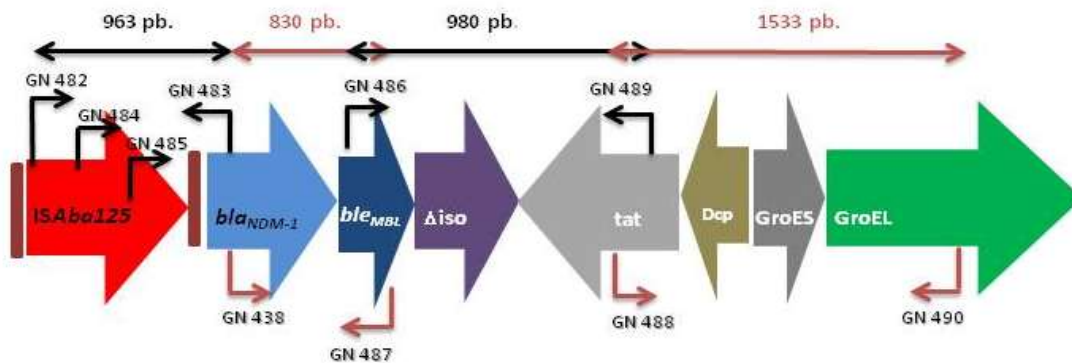


Figura 7. Esquema del análisis del entorno genético del gen *bla_{NDM}* por medio de mapeo por PCR, en el cual para la asociación corriente arriba del gen, se emplean iniciadores directos para la ISAbA125 e iniciador reverso para NDM. Para la evaluación corriente abajo de éste gen, se empleó el primer directo de NDM y reverso para MBL, y así sucesivamente.

Se emplearon algunos iniciadores reportados previamente para la secuencia de inserción ISAbA125 (25), así como, se diseñó un juego de primers para determinar esta misma secuencia de inserción en caso tal de que no se encontrase truncada. De igual manera, se

diseñaron oligonucleótidos específicos de los determinantes genéticos corriente abajo del gen *bla_{NDM}*. Este diseño de primers se realizó a partir de un análisis bioinformático de los entornos genéticos reportados previamente, empleando el programa Primer3 (*Whitehead Institute for Biomedical Research*) para el diseño de oligonucleótidos específicos para los genes descritos en la tabla 3

Todos los productos de amplificación fueron evaluados por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE y teñidos con bromuro de etidio 0.5 µg/mL por 15 minutos. Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados (ambas cadenas) por el Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular – SSiGMol, de la Universidad Nacional de Colombia. Las secuencias obtenidas fueron analizadas por medio de herramientas bioinformáticas, tales como Multalin y Blastn, lo anterior con el fin de determinar tanto la variante del gen *bla_{NDM}*, así como, el entorno genético de este mismo.

PRIMER	SECUENCIA 5' - 3'	NOMBRE	REFERENCIA
GN 482	TCGCTAGACGTAGACGTGGT	<i>ISAba125</i>	Diseñado en este estudio
GN 483	TAATGCGGTGCTCAGCTTCG	<i>NDM-AS</i>	Diseñado en este estudio
GN 484	TGTATATTTCTGTGACCCAC	<i>ISAba125A-S</i>	Poirel, <i>et al.</i> , 2011
GN 485	ACACCATTAGAGAAATTTGC	<i>ISAba125ext-S</i>	Poirel, <i>et al.</i> , 2011
GN 486	TTTGACATCGCGCGCAGC	<i>ble_{MBL}</i>	Diseñado en este estudio
GN 487	GGCGATGACAGCATCATCCG		Poirel, <i>et al.</i> , 2011
GN 488	CGTGGCACAGCATGATCG	<i>tat</i>	Diseñados en este estudio
GN 489	AACACCATGATCGGCTGCAC		
GN 490	ATCTTGGAGCGCGCTCTT	<i>GroEL- AS</i>	Diseñados en este estudio

Tabla 3. Iniciadores empleados para el análisis del entorno genómico de *bla_{NDM}*

4. Resultados

4.1. Origen de los aislamientos

Los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* fueron recuperados de 6 pacientes que estuvieron internados en una unidad neonatal de un hospital de Bogotá. El primer aislamiento de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos fué aislado en agosto de 2011, a partir de un hemocultivo de un neonato pretermino de 3 semanas de nacido, con desarrollo de una sepsis neonatal tardía, el paciente tenía como antecedente una enterocolitis necrotizante IIB, que requirió una colectomía e ileostomía total, el paciente fue tratado con meropenem y rifampicina, con respuesta favorable al tratamiento y hemocultivo negativo en el cuarto día de tratamiento (caso N°1-16KP10)

En diciembre de 2011 se identificaron 3 nuevos aislamientos, en el cual uno de ellos fue obtenido de un hemocultivo de un neonato pretermino con cuadro de enterocolitis IIB, que fue tratado inicialmente con piperacilina/tazobactam pero luego del reporte de dicho aislamiento obtenido, fue tratado con imipenem y ciprofloxacino, dado a que el paciente tenía un resultado previo de depuración de creatinina ≤ 25 mg/dL; este paciente respondió de manera adecuada al tratamiento y fue dado de alto al término de éste (caso N°2- 16KP1).

El siguiente caso fue en un paciente con secuela de una encefalopatía hipóxica-isquémica, en donde fue aislado de un hemocultivo una *K. pneumoniae*. El paciente fue tratado con imipenem y ciprofloxacino, con respuesta favorable a la terapia antibacteriana. Cabe mencionar que este paciente estuvo en la unidad neonatal al mismo tiempo que el primer caso, y tuvo tratamientos previos con piperacilina/tazobactam y gentamicina en dos ocasiones, como tratamiento de una neumonía por aspiración. (Caso N° 03- 16KP7). Posteriormente, en un neonato extremadamente prematuro con asfixia severa neonatal, con compromiso renal y de miocardio; al décimo día de hospitalización desarrolló un cuadro séptico con reporte de crecimiento de *K. pneumoniae* en

hemocultivo, coprocultivo y cultivo de punta de catéter; éste paciente fue tratado con terapia combinada de imipenem y ciprofloxacino y mostró signos de mejoramiento después del tercer día de tratamiento; sin embargo, posteriormente desarrolló una trombosis de vena cava superior y falleció (caso N°04- 16KP2)

En enero de 2012 se presentaron dos nuevos casos de infecciones por *K. pneumoniae*. El primero de ellos, se presentó en un neonato a término con síndrome de dificultad respiratoria por neumonía *in utero*, éste paciente tuvo un deterioro a las 36 horas de vida con una mayor dificultad respiratoria, opacidad apical derecha, neumotórax espontáneo, leucopenia y trombocitopenia. Se reportó crecimiento en hemocultivo de *K. pneumoniae*, el paciente fue tratado con imipenem (dosis de 25 mg/Kg) y ciprofloxacino (15 mg/Kg); al tercer día de tratamiento, los hemocultivos fueron negativos y el paciente tuvo una evolución clínica favorable (caso N°5- 16KP3).

El último caso fue el de un bebé que nació de manera prematura a causa de una corioamnionitis materna. Al decimotercer día de hospitalización, el paciente presentó una grave enterocolitis aguda que evolucionó rápidamente con fallecimiento del paciente. Tanto de la sangre del paciente, como del líquido peritoneal se aisló una *K. pneumoniae* (caso 6- 16KP5). Información clínica adicional se puede detallar en la tabla 4.

4.2. Caracterización molecular y genética de los aislamientos hospitalarios de *Klebsiella pneumoniae* portadores del gen *bla_{NDM}*

4.2.1. Susceptibilidad a antibióticos

Los seis aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* presentaron resistencia a todos los antibióticos β -lactámicos evaluados, excepto aztreonam; así como resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol, gentamicina y amikacina. No obstante, presentaron susceptibilidad a ciprofloxacina, tigeciclina y colistina (tabla 4). Adicionalmente, el test de Hodge modificado mostró que los 6 aislamientos producían algún tipo de carbapenemasa.

Caso/ código	Tiempo gestación (semanas)	Peso al nacer (gramos)	Fenotipo de Resistencia a principales antibióticos											TEST HODGE	
			IPM	MEM	ETP	AZT	CTX	CAZ	TZP	GM	AK	CIP	TGC		CS
1 16KP10	32	1.600	8	≥8	≥4	0.32	64	>64	128	16	32	≤1	0.25	0.25	Pos
2 16KP1	32	1.660	8	≥8	4	0.32	64	>64	128	16	32	≤1	0.25	0.25	Pos
3 16KP7	42	3.000	4	≥8	≥4	0.32	64	>64	128	16	32	≤1	0.25	0.25	Pos
4 16KP2	29	1.000	≥8	≥8	≥4	0.32	≥64	>64	128	16	32	≤1	0.25	0.25	Pos
5 16KP3	38	2.760	4	8	4	0.32	≥64	>64	128	16	32	≤1	0.25	0.25	Pos
6 16KP5	30	1.150	8	≥8	4	0.32	64	>64	128	16	32	≤1	0.25	0.25	Pos

Tabla 4. Características clínicas y microbiológicas de los aislamientos *bla_{NDM}*. En negrilla se destacan los valores asociados a resistencia de acuerdo a los criterios establecidos por el CLSI, 2013.

4.2.2. Detección molecular de genes de resistencia a antibióticos

Todos los aislamientos fueron confirmados como *Klebsiella pneumoniae* por medio de la amplificación del gen *khe*.

En cuanto a la determinación molecular de la resistencia a diferentes antibióticos, en los aislamientos se detectaron los genes codificantes para las beta-lactamasas de tipo SHV (constitutiva de *K. pneumoniae*) y NDM. La secuenciación completa del gen *bla_{NDM}* mostró que este pertenecía a la variante 1 (anexo A). Adicionalmente, los 6 aislamientos poseían integrones clase 1, los cuales transportaban los genes casete *aadB* y *cat3*, que confieren resistencia a aminoglicósidos tales como gentamicina, tobramicina y kanamicina; y cloranfenicol, respectivamente (66, 67).

Los genes de resistencia restantes que fueron evaluados no fueron detectados en los aislamientos analizados. (Tabla N° 5).

Aislamiento	Detección molecular de genes <i>bla</i>														<i>int1</i>	<i>sul1</i>	Región Variable
	<i>TEM</i>	<i>SHV</i>	<i>CTX-M</i>	<i>KPC</i>	<i>NDM</i>	<i>GES</i>	<i>OXA-48</i>	<i>IMP</i>	<i>VIM</i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6') -Ib-cr</i>	<i>AmpC*</i>			
16KP10	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	<i>aadB-catB3</i>
16KP1	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	<i>aadB-catB3</i>
16KP7	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	<i>aadB-catB3</i>
16KP2	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	<i>aadB-catB3</i>
16KP3	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	<i>aadB-catB3</i>
16KP5	Neg	Pos	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	<i>aadB-catB3</i>

Tabla 5. Caracterización molecular de la resistencia a antibióticos en los aislamientos hospitalarios. En negrilla se destacan los resultados asociados a resistencia. *ACC- FOX- MOX- EBC- DHA- CIT

4.2.3. Evaluación de la relación genética entre los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadores del gen *bla_{NDM}*

Se determinó un único pulsotipo mediante el análisis realizado por PFGE, lo cual sugiere que todos los aislamientos están relacionados clonalmente y probablemente esta transmisión fue dada al compartir la misma área de hospitalización entre los pacientes infectados. (Figura 8-A).

De igual manera, los alelos encontrados para los genes *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* y *tonB* fueron 2, 38, 2, 20, 7, 4 y 89, respectivamente. Esta combinación de alelos a la fecha no había sido reportada, razón por la cual el Instituto Pasteur asignó como un nuevo ST 1043. Sin embargo, al consultar la base de datos de los diferentes perfiles alélicos en *K. pneumoniae* del Instituto Pasteur, se determinó que este nuevo ST es una variante de doble loci del ST416 (o DLV- *Double Loci Variant*), previamente reportado en España (68). Dicha variación específicamente en los alelos *mdh* y *pgi*; siendo para el ST 416 1 y 1, respectivamente (Figura 8-B)

A su vez, al hacer un análisis en la similitud de las secuencias de los alelos de este nuevo ST con los previamente reportados en esta especie y asociados a NDM, mediante la herramienta START2 (*Sequence Type Analysis and Recombinational Tests*); se observó una

marcada distancia entre estos ST previamente reportados con respecto al ST 1043, e inclusive con el ST 416 (Figura 8-C). Lo anterior sugiere la adquisición de ésta nueva determinante de resistencia en cepas nativas o autóctonas a nivel local, y no precisamente por la diseminación de un clon previamente reportado.

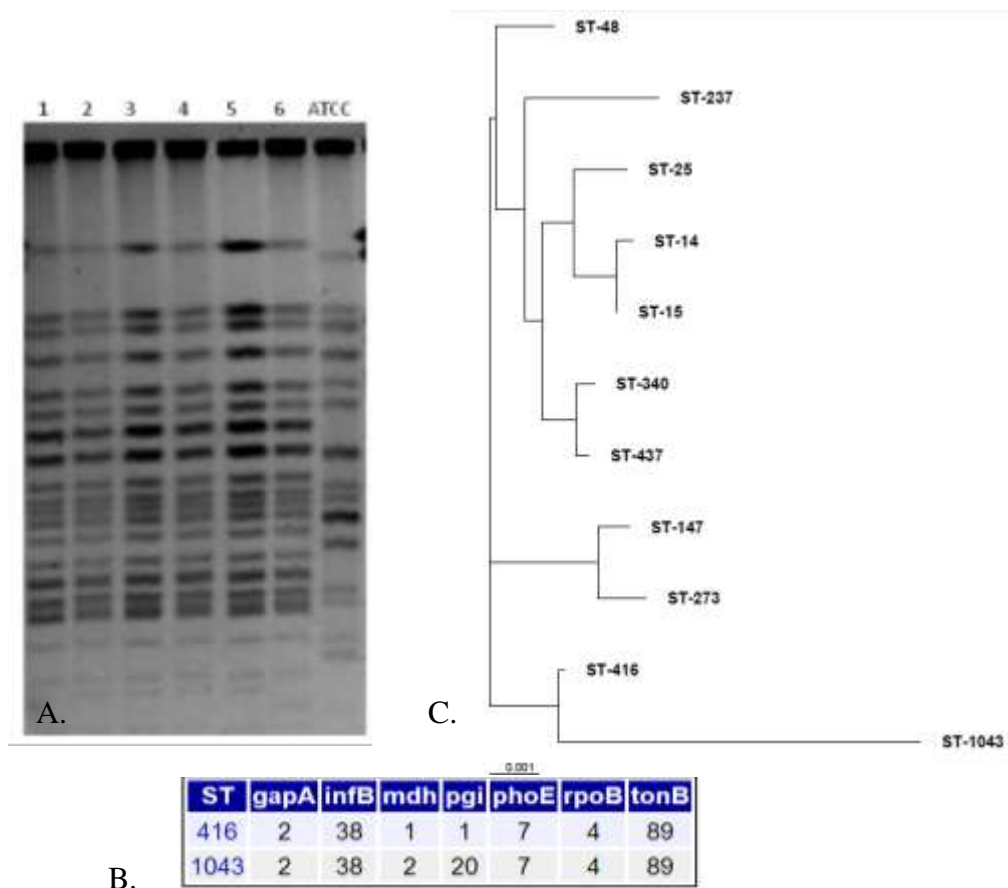


Figura 8. (A). PFGE de los aislamientos hospitalarios de *K. pneumoniae bla_{NDM-1}*. 16KP1 (línea 1), 16KP2 (línea 2), 16KP3 (línea 3), 16KP5 (línea 4), 16KP7 (línea 5), 16KP10 (línea 6), *K. pneumoniae* ATCC 700603. (B). Consulta del perfil alélico en la base de datos MLST de *Klebsiella pneumoniae*. En donde el ST1043 es una variación de doble loci (Double Loci Variant-DLV) del ST416. (C). Cladograma entre los diferentes secuencias de alelos de los principales ST reportados en *K. pneumoniae*-NDM positivas a nivel mundial, así como del ST416 (DLV).

4.3. Detección y caracterización de las posibles plataformas de movilización del gen *bla_{NDM}*

En los aislamientos hospitalarios de *K. pneumoniae* portadores del gen *bla_{NDM}*, se realizaron pruebas de susceptibilidad a tetraciclina (50 µg/mL), ácido nalidíxico (32 µg/mL), rifampicina (100 µg/mL) y azida de sodio (100 µg/mL). Todos los aislamientos hospitalarios presentaron resistencia a ácido nalidíxico y rifampicina, mientras que fueron

susceptibles a azida de sodio y tetraciclina. De acuerdo a lo anterior, se procedió a hacer ensayos de conjugación con las cepas *E. coli* J53-2 Az^r y *E. coli* CAG12177 Te^r. De tal manera, se lograron obtener transconjugantes en 2 de los 6 aislamientos hospitalarios, específicamente de los aislamientos 16KP1 y 16KP3. Estas transconjugantes fueron denominadas C16KP1 (Caz^r/Te^r) y C16KP3 (Caz^r/ Az^r), respectivamente.

En dichos aislamientos transconjugantes, fueron confirmados por molecular tanto la especie mediante la amplificación del gen *uidA* y *khe* por PCR multiplex (genes específicos para *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente); así como, la transferencia del gen *bla_{NDM}* en los extractos de ADN plasmídico obtenidos, lo cual sugiere la localización de éste gen de resistencia en un plásmido conjugativo de tipo A/C. (Figura 9).

Así mismo, mediante la evaluación de la resistencia a antibióticos se evidenció fenotípicamente la resistencia adquirida a antibióticos β-lactámicos tales como ceftazidima, cefotaxima y piperacilina/tazobactam; así como a inhibidores de la vía de folatos, como trimetoprim. Sin embargo, dichos aislamientos presentaron susceptibilidad a amikacina, ciprofloxacina y especialmente, a los antibióticos meropenem y ertapenem; a su vez, la producción de carbapenemasas no se logró determinar mediante el test de Hodge modificado. Igual que en los respectivos aislamientos hospitalarios, fueron detectados por molecular el gen *Int11*; así como la amplificación de la misma región variable, lo cual sugiere la probable movilización de estos genes de resistencia por la misma plataforma de movilización que el gen *bla_{NDM}*. No se detectó el gen *bla_{SHV}* en las cepas transconjugantes obtenidas, que previamente fuese detectado en los aislamientos hospitalarios. (Tabla N° 6).

CEPA	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD A DIFERENTES ANTIBIÓTICOS										DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA				
	EM	ETP	AZT	CAZ	CTX	TMP	TZP	GM	AK	CIP	TEST HODGE	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>Int11</i>	Región Variable
C16KP1	5	0.5	0.64	>64	64	>16	128	16	16	0.25	IND	POS	NEG	POS	<i>aadB- catB3</i>
C16KP3		1	0.125	64	64	>16	128	16	8	0.25	IND	POS	NEG	POS	<i>aadB- catB3</i>

Tabla 6. Evaluación microbiológica y molecular de la resistencia a antibióticos en las transconjugantes obtenidas. En negrilla se destacan los valores asociados a resistencia de acuerdo a los criterios establecidos por el CLSI, 2013. IND.: Indeterminado

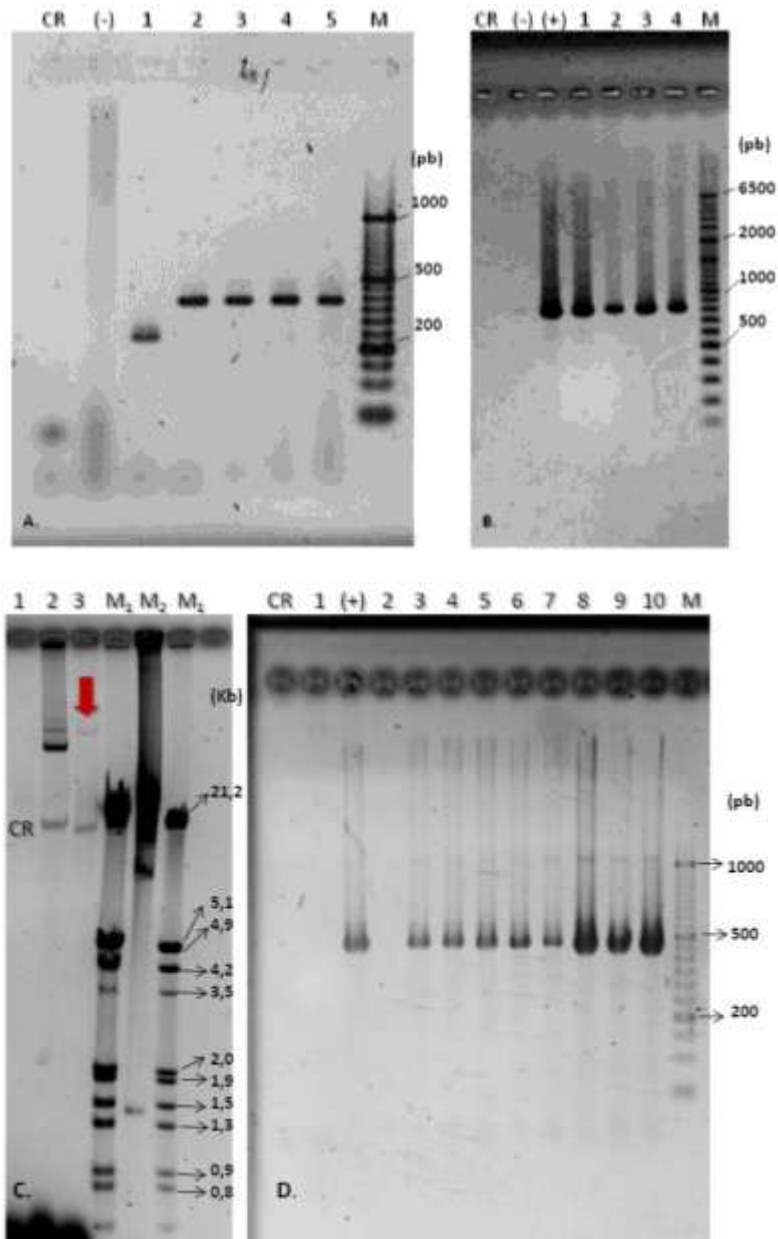


Figura 9. A. Confirmación molecular por medio de la amplificación de genes específicos para *E. coli* y *K. pneumoniae*, con amplímeros de 388 y 243 pb, respectivamente. Control de reactivos (CR), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853(-), *K. pneumoniae* BAA 2146 (línea 1), *E. coli* CAG12177 Te^r (línea 2), *E. coli* J53-2 AZ^r (línea 3), C16KP1 (línea 4), C16KP3 (línea 5), Marcador de peso molecular de 50 pb. (M). B. Confirmación por PCR de la transferencia del gen *bla*_{NDM} en transconjugantes con un producto de amplificación de 819 pb. Control de reactivos (CR), *E. coli* ATCC 25922(-), *K. pneumoniae* BAA 2146 (+), 16KP1 (línea 1), 16KP3 (línea 2), C16KP1 (línea 3), C16KP3 (línea 4), Marcador de peso molecular de 100 pb. (M). C. Electroforesis de ADN plasmídico del aislamiento 16KP3 y su respectiva transconjugante mediante el procedimiento descrito por Takahashi y Nagano. *E. coli* J53-2 AZ^r (línea 1), 16KP3 (línea 2), C16KP3 (línea 3), Lambda DNA/ EcoRI+HindIII marker (M1), λ DNA-Mono Cut Mix (M2), CR (cromosomal). D. Clasificación del grupo de incompatibilidad A/C mediante PCR con producto de 465 pb en DNA plasmídico. Control de reactivos (CR), *E. coli* CAG12177 Te^r (línea 1), *K. pneumoniae* BAA 2146 (+), *E. coli* J53-2 AZ^r (línea 2), 16KP1 (línea 3), 16KP2 (línea 4), 16KP3 (línea 5), 16KP5 (línea 6), 16KP7 (línea 7), 16KP10 (línea 8), C16KP1 (línea 9), C16KP3 (línea 10), Marcador de peso molecular de 50 pb. (M).

Adicionalmente, fueron detectados en las donantes tres plásmidos de ≥ 2.0 , 85 y 170 Kb, respectivamente. De igual manera, se evidenció molecularmente la transferencia de un plásmido ≥ 170 Kb desde los aislamientos donantes a las células de *E. coli* recipientes (señalados con la flecha roja en la figura N° 9-C y 10. Estos resultados son congruentes con resultados obtenidos posteriormente mediante secuenciación del genoma de uno de estos aislamientos hospitalarios (resultados en proceso de publicación), ver anexo B

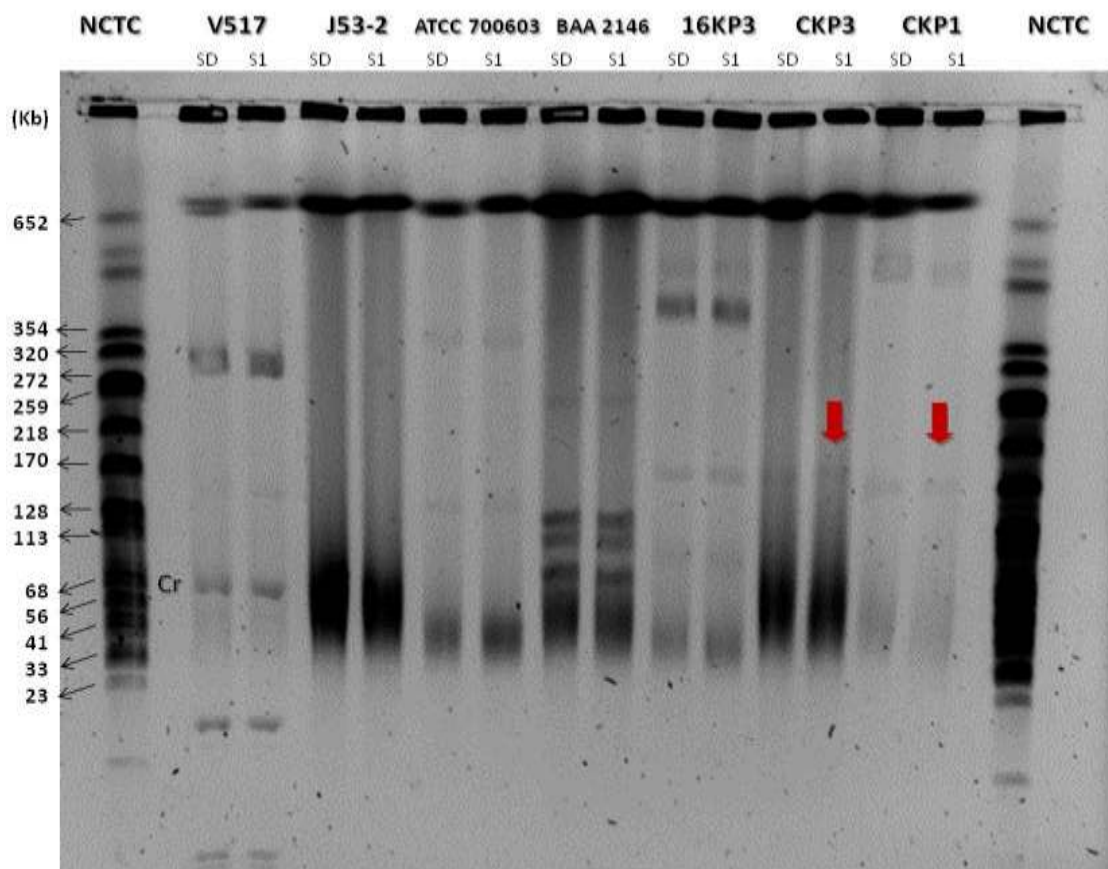


Figura 10. Perfil de restricción plasmídico con y sin S1, resueltos mediante PFGE en diferentes aislamientos. *E. coli* V517 (plásmidos de 56.4 – 7.6- 5.8 y 5.3 Kb, respectivamente); *E. coli* J53-2 Az^r (Cr, Cromosomal); *K. pneumoniae* ATCC 700603 (plásmido de 160 Kb); *K. pneumoniae* ATCC BAA 2146 (plásmidos de 140, 117 y 85 Kb); *K. pneumoniae* 16KP3 (plásmidos de ≥ 170 y 85 Kb, respectivamente); transconjugantes de *E. coli* C16KP3 y C16KP1 (plásmido ≥ 170 Kb); *S. aureus* NCTC 8325 digerido con SmaI.

4.4. Evaluación del entorno genético del gen *bla_{NDM}*

Con la estrategia de mapeo por PCR, se evaluaron tanto los aislamientos hospitalarios como las transconjugantes obtenidas, aunque solo los productos de PCR del aislamiento 16KP1 fueron secuenciados y posteriormente analizados por las diferentes herramientas

bioinformáticas. Lo anterior dada a la estrecha relación genética entre los diferentes aislamientos hospitalarios estudiados. Así mismo, como ya se había mencionado antes, mediante esta técnica se logró identificar la variante 1 para este gen codificante de carbapenemasa.

Se logró determinar corriente arriba del gen *bla*_{NDM-1} la secuencia de inserción *ISAb_a125*. Corriente abajo de éste se encontraron los genes *ble*_{MBL}, *tat*, *GroES* y *GroEL* (Figura 11 y 12). Estos hallazgos fueron confirmados con los resultados obtenidos por medio de la secuenciación masiva (resultados en proceso de publicación). Así mismo, estos resultados fueron comparados con los diferentes entornos genéticos reportados para NDM-1 en especies de enterobacterias y no fermentadoras de gran importancia clínica como *Acinetobacter spp.*(25)

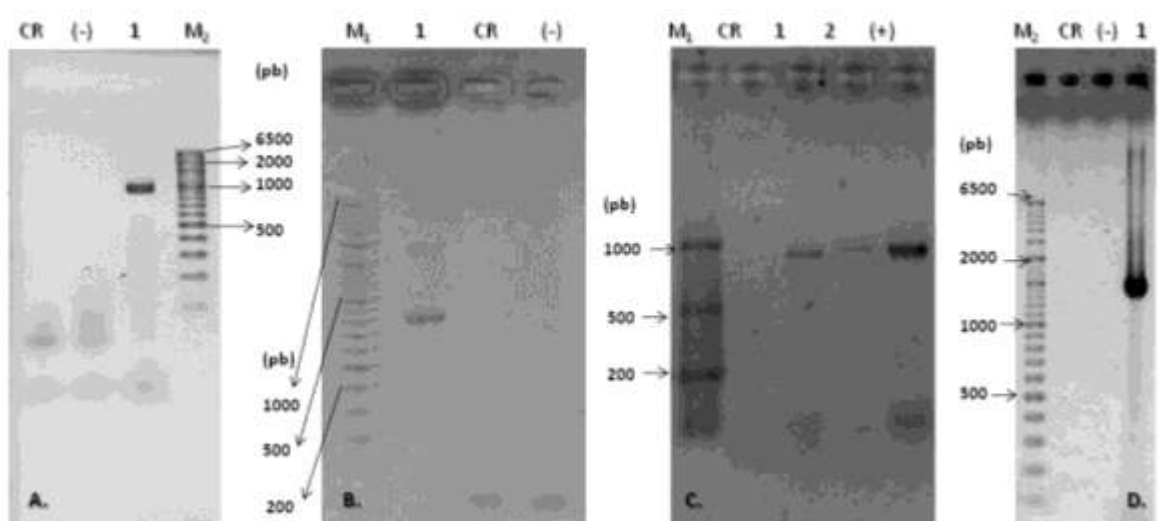


Figura 11. Evaluación del entorno genético del gen *bla*_{NDM-1} en la cepa 16KP1. (A) Producto de 963 pb. amplificado por la asociación de la secuencia de inserción *ISAb_a125* y el gen *bla*_{NDM-1}. (B) Producto de 830 pb obtenido por la asociación del gen *bla*_{NDM-1} y el gen *ble*_{MBL}. (C) Amplicón de 980 pb obtenido por mapeo del gen *ble*_{MBL} y *tat*. (D) Producto de pcr obtenido mediante la asociación de *tat* y *GroEL*. Control de reactivos (CR), marcadores de peso de 50 y 100 pb, respectivamente (M1, M2).16KP1 (línea 1) y transconjugante C16KP1 (línea 2).

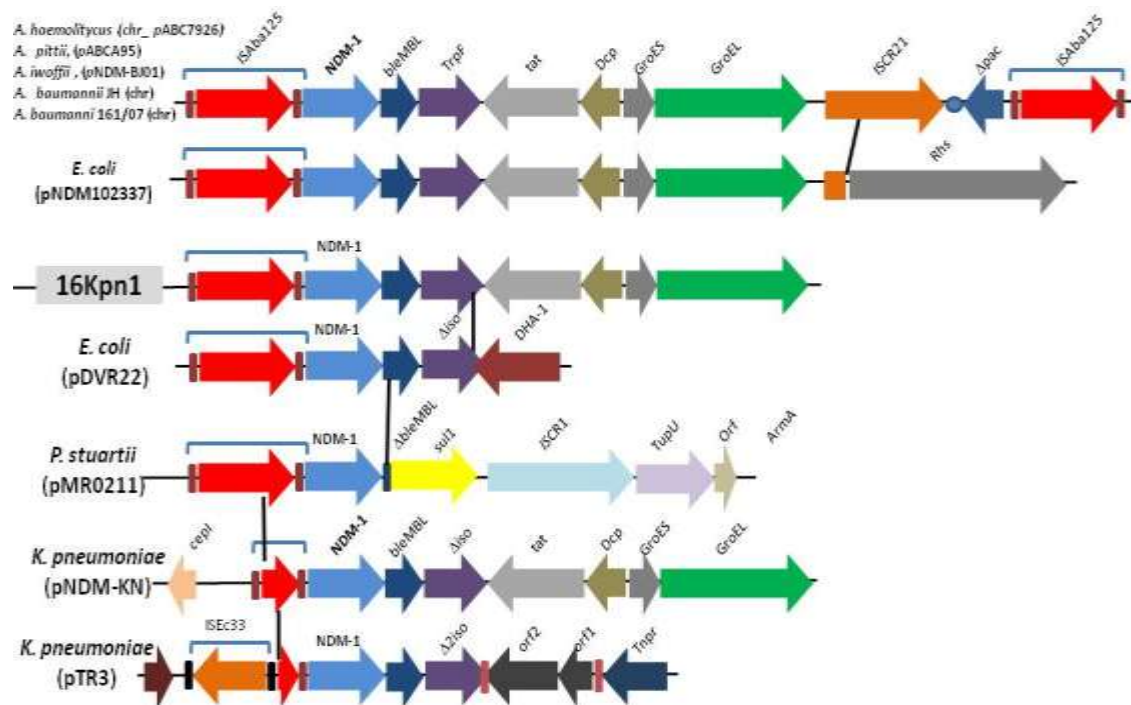


Figura 12. Comparación del entorno genético del aislamiento 16KP1 y *Acinetobacter pittii* plásmido ABCA95 cepa pABCA95, *Acinetobacter lwoffii* cepa WJ10621 plásmido pNDM-BJ01, *Acinetobacter haemolyticus* cepa ABC7926 plásmido pABC7926, *A. baumannii* cepa 161/07, *A. baumannii* JH, *E. coli* pNDM102337, *E. coli* pDVR22, *Providencia stuartii* plásmido pMR0211, *K. pneumoniae* cepa KP7 plásmido pNDM-KN, y *K. pneumoniae* plásmido ptr3 (GenBank números de la adhesión JQ739157.1, JQ001791.1, JQ080305.1, HQ857107.1, JN872329.1, JF714412.1, JF922606.1, JN687470.1, JN157804.1, y JQ349086.2, respectivamente).

5. Discusión

Klebsiella pneumoniae es un patógeno oportunista que ha sido frecuentemente asociado a infecciones adquiridas tanto en la comunidad como a nivel hospitalario, su relevancia clínica radica principalmente en que se encuentra entre los patógenos más comúnmente recuperados de infecciones en UCI; también es uno de los patógenos que más fácilmente desarrolla mecanismos de resistencia a múltiples clases de antibióticos y que a su vez, ha venido aumentando a gran escala y de manera alarmante (69-71). Debido a este fenómeno, los antibióticos carbapenémicos han sido los agentes de elección para el tratamiento de infecciones por *K. pneumoniae* multirresistente, principalmente por su amplio espectro de acción y como única alternativa para el tratamiento de infecciones ocasionadas por este tipo de microorganismos productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (70).

En los últimos años, el consumo de antibióticos de tipo carbapenémicos ha aumentado de manera drástica a nivel mundial y por supuesto Colombia no es ajena a esta situación (71-73) Este aumento en el uso de carbapenémicos, aunque ha logrado salvar vidas y reducir índices de mortalidad por este tipo de infecciones, en consecuencia ha generado la selección de aislamientos resistentes a esta clase de antibióticos. Uno de los principales mecanismos asociados a resistencia a carbapenémicos, es la adquisición y producción de enzimas carbapenemasas. Desde el año 2005 se han reportado aislamientos productores de carbapenemasas en nuestro país, principalmente aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC (6, 28, 74). No obstante, la diseminación de aislamientos productores de carbapenemasas en diferentes países, ha acrecentado la problemática global de la resistencia antibacteriana; especialmente desde el año 2008, con la alerta a nivel mundial de la emergencia de aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de NDM, esto debido a su potente capacidad de hidrólisis de antibióticos β -lactámicos y carbapenémicos, así como por su gran capacidad de diseminación (16, 49, 75).

El estudio de estos 6 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos aislados en pacientes de una unidad neonatal y enmarcado en un sistema de vigilancia epidemiológica a nivel hospitalario, logró identificar por primera vez en nuestro país y Suramérica aislamientos productores de la metalo- β -lactamasa tipo NDM-1. El propósito de este estudio fue determinar las características moleculares y genéticas en dichos aislamientos; así como, caracterizar las posibles estructuras de movilización responsables de la emergencia o diseminación de este gen en nuestro país.

Para tal efecto se realizó la evaluación de la susceptibilidad de los aislamientos hospitalarios a los diferentes antibióticos descritos en la tabla 4, en donde se observó la resistencia a los antibióticos β -lactámicos y carbapenémicos evaluados, a excepción del monobactámico, aztreonam. Según lo anterior, no solamente se correlaciona con la detección del gen *bla_{NDM-1}*, que proporciona un fenotipo de resistencia a todos los β -lactámicos, excepto a aztreonam (75, 76); sino también por la ausencia de otros genes evaluados y codificantes de BLEE, tales como TEM, CTX-M y/o AmpC de tipo plasmídico. De igual manera, se evidenció resistencia a gentamicina, amikacina y trimetoprim/sulfamethoxazol, y solo se observó susceptibilidad a ciprofloxacina, tigeciclina y colistina; confiriéndoles un fenotipo de multiresistencia. Lo anterior dado a la presencia de los genes en casete *aadB-catB3* en un Integrón de clase 1, cabe destacar que éste tipo de casete es idéntico a uno previamente reportado en un aislamiento de *E. coli* productor de *qnrA1*; asociado a un plásmido conjugativo de 41 Kb y aislado de una muestra de orina en una paciente hospitalizada en Porto Alegre, Brasil (66).

Así mismo, se logró establecer en estos aislamientos un único pulsotipo mediante PFGE (Figura 8-A), lo cual sugiere un brote de *K. pneumoniae* productora de NDM-1 en dicha unidad neonatal y posiblemente esta transmisión fue dada al compartir la misma área de hospitalización entre los pacientes infectados; sin embargo, dichos pacientes fueron ingresados a la unidad neonatal desde su nacimiento y en sus progenitoras no se documentó algún nexo epidemiológico de viajes a zonas con una alta prevalencia de aislamientos productores de NDM-1. Por lo tanto, es probable que aislamientos autóctonos que representan este nuevo ST1043, adquirieran el plásmido portador del gen *bla_{NDM-1}* de manera tal como ha sido reportado previamente en Europa (77) e inclusive como en otras especies de tipo oportunista tales como *Morganella morganii* y *Providencia rettgeri* (78, 79). Justamente este ST1043 no había sido reportado previamente en *Klebsiella pneumoniae* o asociado a aislamientos productores de algún tipo de β -lactamasas, y pese a que es un DLV del ST416 que a su vez ha sido reportado previamente en aislamientos hospitalarios productores del gen *bla_{DHA-1}* en España (68), así como en otro aislamiento productor de CTX-M-15 y *QnrB1* en República Checa (80); se observó que no solamente distan genéticamente entre sí, sino también con los

principales ST en *K. pneumoniae* productores de NDM reportados a nivel mundial (25, 81-83) (Figura 8). En razón de lo expuesto, se ratifica una vez más la gran capacidad de diseminación de NDM y de cómo este logró emerger en nuestro entorno.

Ahora bien, teniendo en cuenta la capacidad de diseminación de NDM y la variabilidad en las plataformas genéticas para su movilización, dado que no solamente se ha asociado a un sin número de plásmidos de diferentes características genéticas, sino también ha sido integrado cromosómicamente en algunas especies de enterobacterias u otras especies de gran importancia clínica de tipo oportunistas (25, 84, 85); es imperativo la caracterización de las posibles estructuras involucradas en la movilización de este gen. Es por ello que esta caracterización en los aislamientos *bla_{NDM-1}* reveló que éste mecanismo de resistencia fuese movilizado en un plásmido conjugativo, ya que los ensayos de conjugación para la transferencia del gen *bla_{NDM-1}* a partir de los aislamientos *K. pneumoniae* a las respectivas cepas receptoras de *E. coli*, mostró la transferencia de un plásmido ≥ 170 Kb y del grupo de incompatibilidad A/C (Figura 9-10).

Este hallazgo es de gran importancia, puesto que este grupo de incompatibilidad ya ha sido reportado previamente en la movilización de genes de resistencia a antibióticos en bacilos gram negativos (86); y especialmente asociados a la diseminación del gen *bla_{NDM-1}* en diferentes especies de enterobacterias y *Acinetobacter baumannii* (25, 85, 87-89), particularmente en *K. pneumoniae* aisladas en Suiza (90) y Kenia (91), *Proteus mirabilis* aislados en Suiza y *E. coli* aislados en Francia (25). Del mismo modo, se han detectado este tipo de plásmidos en especies de *E. coli*, *Citrobacter freundii* y *Vibrio cholerae* portadores del gen *bla_{NDM-1}* en muestras de agua tomadas del ambiente en Nueva Delhi, India (92); destacando así el potencial de este tipo de plásmido como vehículo en la propagación del gen *bla_{NDM-1}*.

De igual manera, plásmidos del grupo A/C han sido ampliamente investigados en los últimos años, puesto que se ha demostrado su papel como una de las principales plataformas para la diseminación del gen *bla_{CMY-2}* (codificante de una cefalosporinasa) frecuentemente identificado en *E. coli* y *Salmonella spp.* en Estados Unidos, Canadá y Europa (93-96). Así mismo, se han aislado no solamente en muestras de origen humano, sino también de origen veterinario; por ejemplo, en muestras de carne de res, pollo, pavo, cerdo, entre otras (97).

Igualmente, cabe destacar que estos plásmidos poseen un amplio rango de replicación en bacterias, razón por la cual, no solamente se han identificado en diferentes especies de enterobacterias, sino también en *Photobacterium damsela* y *Aeromonas salmonicida* (98). Lo anterior, implica uno de los desafíos más difíciles para contrarrestar la diseminación de la resistencia a antibióticos; puesto que los plásmidos no solo contribuyen en la diseminación de determinantes de resistencia mediada por la transferencia horizontal entre bacterias de diferentes especies, sino que también albergan factores de virulencia y/o sistemas de adicción, que promueven su estabilidad y mantenimiento en huéspedes bacterianos bajo diferentes condiciones ambientales (99).

No obstante, las cepas transconjugantes de *E. coli* presentaron un fenotipo de resistencia a antibióticos β -lactámicos; tales como ceftazidima, cefotaxima y piperacilina/tazobactam, así como a trimetoprim y gentamicina. Por otro lado, presentaron susceptibilidad a amikacina, ciprofloxacina y especialmente, a los antibióticos meropenem y ertapenem; de igual modo, la producción de carbapenemasas no se logró determinar mediante el test de Hodge modificado (tabla 6). De acuerdo con lo anterior, pese a que dichas cepas presentaron susceptibilidad a los carbapenémicos evaluados y aun así molecularmente fueron detectados en DNA plasmídico el gen *bla_{NDM}*; dicho fenotipo podría asociarse a características genéticas inherentes a la cepa receptora para la capacidad de expresión de este plásmido transferido, razón por la cual es necesario realizar estudios *in vitro* para la evaluación del costo genético y/o estabilidad del plásmido en la cepa receptora, lo cual permitan dilucidar este caso en particular.

Por último, la caracterización molecular del entorno genético en estos aislamientos determinó la asociación de la secuencia de inserción *ISAba125* (secuencia que ha sido asociada al *Tn125* en *Acinetobacter baumannii*) y el gen *bla_{NDM-1}* (Figura 11 y 12). Cabe destacar que, NDM no solo ha logrado diseminarse de manera eficiente gracias a su movilización en plataformas genéticas de fácil transferencia como son los plásmidos, que en su mayoría son auto-replicables, con una gran capacidad de reordenamiento y co-transportan diferentes genes de resistencia; sino que generalmente es transportada en el transposón 125 (*Tn125*)(100), una plataforma genética que favorece su movilización y a su vez localizados en plásmidos conjugativos. Se ha sugerido que el origen de este gen de resistencia fue dado entre *Acinetobacter baumannii* y un microorganismo ambiental, debido a que en todos los reportes se ha encontrado la secuencia de inserción *ISAba125* (de manera completa o remanentes de la misma) corriente arriba del gen *bla_{NDM-1}* (101).

Adicionalmente los hallazgos en el entorno genético corriente abajo del gen *bla_{NDM-1}* en los aislamientos manifiestan la presencia del gen *ble_{MBL}* el cual confiere resistencia a bleomicina (Figura 12), que a su vez ha sido empleado en el tratamiento contra el cáncer. Se ha determinado que estos genes se encuentran bajo el control de un mismo promotor que está localizado corriente arriba del gen *bla_{NDM}* y al extremo de la secuencia de inserción *ISAba125*, por lo tanto sugiere la propagación de NDM en consecuencia no sólo de la presión selectiva de antibióticos β -lactámicos sino también por la presión selectiva de medicamentos contra el cáncer y/o moléculas del medio ambiente (102). Sumado a esto, recientemente se encontró el gen *bla_{NDM}* asociado a la segunda región variable de un integrón clase 1 (103), lo cual tiene como potencial el aumento en su movilización y diseminación entre diferentes especies bacterianas.

Según los hallazgos del estudio de estos aislamientos productores del gen *bla_{NDM-1}* y por primera vez asociados a un brote en una unidad neonatal, indican que la emergencia de NDM en nuestro país no es debida a la entrada de uno de los clones de *K. pneumoniae* reportados en otros países (figura 5), sino posiblemente a la transferencia horizontal del gen *bla_{NDM-1}* mediante un plásmido conjugativo tipo A/C desde otra especie bacteriana (por ejemplo *Acinetobacter baumannii*). Este fenómeno de diseminación es diferente al encontrado con *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC, el cual se debe casi exclusivamente a la diseminación del clon ST258, que fue reportado en Estados Unidos e Israel previo a su diseminación en Colombia (6, 74).

Cabe mencionar que los resultados obtenidos en este estudio fueron publicados en la revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, volumen 57, edición N° 4 del año 2013 (DOI: 10.1128/aac.01447-12). Sin embargo, esta hipótesis debe ser investigada de manera precisa y más profunda, razón por la cual el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad el Bosque, a la luz de profundizar estos resultados y enmarcado en un proyecto financiado por la misma Universidad; ideó y ejecutó un proyecto de investigación con el objetivo de secuenciar el genoma de uno de estos aislamientos y en el que tales hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos en este estudio, así mismo dichos resultados se encuentran en proceso de publicación

No obstante, estos resultados demuestran la facilidad de propagación intra-hospitalaria de especies de enterobacterias causantes de infección, poniendo en manifiesto las limitadas opciones terapéuticas para su tratamiento y por ende el aumento en los riesgos

de mortalidad en estos pacientes y, peor aún, lo que debe ser temido es un escenario desastroso en la evolución a la panresistencia. Por otra parte, el envejecimiento en la población, el auge de la resistencia en patógenos asociados a unidades de cuidados intensivos y/o en unidades de trasplante de órganos, los tratamientos anti-cancerígenos, son factores que conducen a un aumento de la inmunodepresión, haciendo que los pacientes sean blancos ideales para la infección por bacterias productoras de carbapenemasas.

Así mismo, esta resistencia puede ir evolucionando de la condición estrictamente hospitalaria a la de las infecciones adquiridas en la comunidad, razón por la cual es importante reforzar las medidas de control de infecciones, para así evitar diseminación cruzada de microorganismos multirresistentes; así como, fortalecer los sistemas de vigilancia epidemiológica que proporcionan una retroalimentación al personal médico y clínico involucrados en el manejo de los pacientes y de esta manera poner en práctica las medidas de intervención apropiadas para este posible escenario y poco optimista para la problemática actual en salud pública.

6. Conclusiones

- El primer reporte en Colombia y Suramérica de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadores del gen *bla_{NDM-1}* causantes de un brote en una unidad neonatal en un hospital de Bogotá.
- La emergencia de NDM en nuestro país posiblemente a la adquisición de un plásmido conjugativo portador de este gen en aislamientos “autóctonos” de *Klebsiella pneumoniae* ST1043.
- La movilización del gen *bla_{NDM-1}* en un plásmido conjugativo ≥ 170 Kb y del grupo de incompatibilidad A/C, grupo de amplio rango de hospedero y previamente reportado a nivel mundial en la movilización de genes de resistencia a antibióticos tales como el gen *bla_{NDM-1}*.
- El entorno genético en estos aislamientos determinó la asociación de la secuencia de inserción IS*Aba125* y el gen *bla_{NDM-1}*; así como, corriente debajo de este el gen *ble_{MBL}*. Esta estructura de movilización se ha asociado al transposón *Tn125*, asociado a *Acinetobacter baumannii*.
- La emergencia de aislamientos productores de NDM en Colombia implica un nuevo y preocupante desafío para los sistemas de vigilancia y para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gram negativas. Así mismo, estos resultados son consistentes con otros reportes que han demostrado la facilidad de la diseminación de los mecanismos de resistencia en estos patógenos de gran importancia a nivel hospitalario.

Anexo A: Alineamiento de la secuencia obtenida por amplificación y secuenciación del gen *blanDM* en el aislamiento 16KP1

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	GGCAGAGTAAACTTGAGTGCACATAAACCCACTTAATTAATTAAGAGGTTATGAGATATATAAATTTGTACACATCATCTTAACTTGAGAGCTGACTGCATTAATGCTTGAGTCAGAGAAAG													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	AAGGCTTTTCAGCCAGAAATTTGCTGAACCTTAARAGCATCTAGTACGATCTATCGTAGCTAARAGAAATAGCATCAATGAGCTTATCAAGCTCGATATGCTTCTGATACACCTTCGCTAG													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	ACGTAGCGTGGTACAGAAACTCAAACTGATTCATCTCTGGAATTTATGTTGAGGCGATCCGTTTATGGTCTCCACGAAATAGCAAGCGTTTAAAGACATTCCTGATTTGGATCAA GAGGCGATCCGTTTATGGTCTCCACGAAATAGCAAGCGTTTAAAGACATTCCTGATTTGGATCAA GAGGCGATCCGTTTATGGTCTCCACGAAATAGCAAGCGTTTAAAGACATTCCTGATTTGGATCAA													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	ACATGATGTAGCCATACAGCATTATTCACGATACAGCATTACCAAGGGTGGTGAARAAAGACTTATATCTGCTACGTCATGAAATAAAGCGAAAGCTACGCGTGAACCTAARA ACATGATGTAGCCATACAGCATTATTCACGATACAGCATTACCAAGGGTGGTGAARAAAGACTTATATCTGCTACGTCATGAAATAAAGCGAAAGCTACGCGTGAACCTAARA ACATGATGTAGCCATACAGCATTATTCACGATACAGCATTACCAAGGGTGGTGAARAAAGACTTATATCTGCTACGTCATGAAATAAAGCGAAAGCTACGCGTGAACCTAARA													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	AAGATCTATATACAGGATTAARACTTATTCAGGCGCCAGCCAGGTCAGAAAGAAATACCGGGTCATTGGAGGCTGATTTAATTAAGGTAAGACAAATAAAGTTCATGACACACCT AAGATCTATATACAGGATTAARACTTATTCAGGCGCCAGCCAGGTCAGAAAGAAATACCGGGTCATTGGAGGCTGATTTAATTAAGGTAAGACAAATAAAGTTCATGACACACCT AAGATCTATATACAGGATTAARACTTATTCAGGCGCCAGCCAGGTCAGAAAGAAATACCGGGTCATTGGAGGCTGATTTAATTAAGGTAAGACAAATAAAGTTCATGACACACCT													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	TATTGACGAATACCGGCTGTATCTTGGACACTTACTGATCAAGGCGAATCACTGCGCAGGCTTACTGAGGCTGATTAATTAAGGTAAGACAAATAAAGTTCATGACACACCT TATTGACGAATACCGGCTGTATCTTGGACACTTACTGATCAAGGCGAATCACTGCGCAGGCTTACTGAGGCTGATTAATTAAGGTAAGACAAATAAAGTTCATGACACACCT TATTGACGAATACCGGCTGTATCTTGGACACTTACTGATCAAGGCGAATCACTGCGCAGGCTTACTGAGGCTGATTAATTAAGGTAAGACAAATAAAGTTCATGACACACCT													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	CGTGAGCTGAGTGTACAGACATAAATACCTGAGAGATTTAGCATAGTGTATTTCTGACCCACATTCACCTGGCAAAAGGCAATCGAATATGATGGTTAATAGGCAATATT CGTGAGCTGAGTGTACAGACATAAATACCTGAGAGATTTAGCATAGTGTATTTCTGACCCACATTCACCTGGCAAAAGGCAATCGAATATGATGGTTAATAGGCAATATT CGTGAGCTGAGTGTACAGACATAAATACCTGAGAGATTTAGCATAGTGTATTTCTGACCCACATTCACCTGGCAAAAGGCAATCGAATATGATGGTTAATAGGCAATATT													
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	TACCTAAGGGATGATTAATACGCGAATCAGCATATTTAATCAAGTTCGATGCTGACTGATCACTGCTCCTAGAAAGGCGTATGATGGCTTACACCATTAAGAAATTTGCTGAGCTGTGTA TACCTAAGGGATGATTAATACGCGAATCAGCATATTTAATCAAGTTCGATGCTGACTGATCACTGCTCCTAGAAAGGCGTATGATGGCTTACACCATTAAGAAATTTGCTGAGCTGTGTA TACCTAAGGGATGATTAATACGCGAATCAGCATATTTAATCAAGTTCGATGCTGACTGATCACTGCTCCTAGAAAGGCGTATGATGGCTTACACCATTAAGAAATTTGCTGAGCTGTGTA													
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	TTATCATATGGCTTTGAACTGCGACCTCATGTTTGAATTCGCAATGAAATGGCCAAATATATGACCCGGTCCGAGGCTGAGCACCAGCTTACCGCTGATTTGCTGAGCGGGTGCATGCC TTATCATATGGCTTTGAACTGCGACCTCATGTTTGAATTCGCAATGAAATGGCCAAATATATGACCCGGTCCGAGGCTGAGCACCAGCTTACCGCTGATTTGCTGAGCGGGTGCATGCC TTATCATATGGCTTTGAACTGCGACCTCATGTTTGAATTCGCAATGAAATGGCCAAATATATGACCCGGTCCGAGGCTGAGCACCAGCTTACCGCTGATTTGCTGAGCGGGTGCATGCC													
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	CGTGAAATCCGCCAGCATTTGGCCAGAAATGAAACTGGCGACCAAGGTTTGGCAGTGGTTTTCCGCCAGCTCGACCCGAGTGTGGCGACACCTTCTTATCTGCAATCGGGTTCCGG CGTGAAATCCGCCAGCATTTGGCCAGAAATGAAACTGGCGACCAAGGTTTGGCAGTGGTTTTCCGCCAGCTCGACCCGAGTGTGGCGACACCTTCTTATCTGCAATCGGGTTCCGG CGTGAAATCCGCCAGCATTTGGCCAGAAATGAAACTGGCGACCAAGGTTTGGCAGTGGTTTTCCGCCAGCTCGACCCGAGTGTGGCGACACCTTCTTATCTGCAATCGGGTTCCGG													
	1301	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400	1410	1420	1430
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	CGATCGCTCCACCGGTTGATCGTCAGGGATGGCGCCGCTGCTGGTGGTCAATCCGCTGGACGATGACCGACCCGAGCTTCACTGATCAAGCAGGAGATCACTCCGGTCCGCG CGATCGCTCCACCGGTTGATCGTCAGGGATGGCGCCGCTGCTGGTGGTCAATCCGCTGGACGATGACCGACCCGAGCTTCACTGATCAAGCAGGAGATCACTCCGGTCCGCG CGATCGCTCCACCGGTTGATCGTCAGGGATGGCGCCGCTGCTGGTGGTCAATCCGCTGGACGATGACCGACCCGAGCTTCACTGATCAAGCAGGAGATCACTCCGGTCCGCG													
	1431	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	TGGCGGTTGACTCAGCGCATCAGGACAGATGGCGGATGGACCGCTGATCGCGGGGATGCGACTTATGCCAATGCGTGTGCAACAGCTTCCGCCAGAGAGGGATGGTTCGGGCGCA TGGCGGTTGACTCAGCGCATCAGGACAGATGGCGGATGGACCGCTGATCGCGGGGATGCGACTTATGCCAATGCGTGTGCAACAGCTTCCGCCAGAGAGGGATGGTTCGGGCGCA TGGCGGTTGACTCAGCGCATCAGGACAGATGGCGGATGGACCGCTGATCGCGGGGATGCGACTTATGCCAATGCGTGTGCAACAGCTTCCGCCAGAGAGGGATGGTTCGGGCGCA													
	1561	1570	1580	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	ACACAGCTGACTTCCGCCCAATGGCTGGTGCACACAGCAGCCGCGCCCACTTTGGCCGCTCAGGATTTTACCCGGCCCGCCACACAGTACCAATATCCCGTGGATCGAGCGACCC ACACAGCTGACTTCCGCCCAATGGCTGGTGCACACAGCAGCCGCGCCCACTTTGGCCGCTCAGGATTTTACCCGGCCCGCCACACAGTACCAATATCCCGTGGATCGAGCGACCC ACACAGCTGACTTCCGCCCAATGGCTGGTGCACACAGCAGCCGCGCCCACTTTGGCCGCTCAGGATTTTACCCGGCCCGCCACACAGTACCAATATCCCGTGGATCGAGCGACCC													
	1691	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810	1820
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	GACATCGCTTTTGGTGGCTGCTGATCAGGACAGCAGGCGAAGTCCGTCGCAATCTCGGTGATGCCACACTGAGCACTACGCGCGCTCAGCGCGCGCTTTGGTGGCGCTTCCACAGGCGACGA GACATCGCTTTTGGTGGCTGCTGATCAGGACAGCAGGCGAAGTCCGTCGCAATCTCGGTGATGCCACACTGAGCACTACGCGCGCTCAGCGCGCGCTTTGGTGGCGCTTCCACAGGCGACGA GACATCGCTTTTGGTGGCTGCTGATCAGGACAGCAGGCGAAGTCCGTCGCAATCTCGGTGATGCCACACTGAGCACTACGCGCGCTCAGCGCGCGCTTTGGTGGCGCTTCCACAGGCGACGA													
	1821	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	TGATCGTATGAGCCATTCGCCCCGATAGCCGCGCGCAATCACTCATACGGCCGATGGCCGACAGCTGGCTGAATGGCTGACCACTACCCCAATCTGCCATCGCGGATTCGATGTGAC TGATCGTATGAGCCATTCGCCCCGATAGCCGCGCGCAATCACTCATACGGCCGATGGCCGACAGCTGGCTGAATGGCTGACCACTACCCCAATCTGCCATCGCGGATTCGATGTGAC TGATCGTATGAGCCATTCGCCCCGATAGCCGCGCGCAATCACTCATACGGCCGATGGCCGACAGCTGGCTGAATGGCTGACCACTACCCCAATCTGCCATCGCGGATTCGATGTGAC													
	1951	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	AGAGGGCTTTATCGAGCTGGGCTTGCAGCGATTTGAGAGGATCGCGCTGGATGATCTGACGCGCGGGTTTACAGCTCGAATCTTCCCTATCTGACCTGACCCAGCTACAGGCTCGTT AGAGGGCTTTATCGAGCTGGGCTTGCAGCGATTTGAGAGGATCGCGCTGGATGATCTGACGCGCGGGTTTACAGCTCGAATCTTCCCTATCTGACCTGACCCAGCTACAGGCTCGTT AGAGGGCTTTATCGAGCTGGGCTTGCAGCGATTTGAGAGGATCGCGCTGGATGATCTGACGCGCGGGTTTACAGCTCGAATCTTCCCTATCTGACCTGACCCAGCTACAGGCTCGTT													
	2081	2090	2100	2110	2120	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	GGCTGTTGCTGCGGTTGATGATCTCATGCTGATGGTGGATTTGGTGAACCGCGGAGGCGGAGGAAAGACCCGCTGGCCGCGCTTCAAGCTCCGCACTGGAGGCGAGCGGCTGAGGATCG GGCTGTTGCTGCGGTTGATGATCTCATGCTGATGGTGGATTTGGTGAACCGCGGAGGCGGAGGAAAGACCCGCTGGCCGCGCTTCAAGCTCCGCACTGGAGGCGAGCGGCTGAGGATCG GGCTGTTGCTGCGGTTGATGATCTCATGCTGATGGTGGATTTGGTGAACCGCGGAGGCGGAGGAAAGACCCGCTGGCCGCGCTTCAAGCTCCGCACTGGAGGCGAGCGGCTGAGGATCG													
	2211	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300	2310	2320	2330	2340
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	GCTACTGATCGATCCGACTGACGCTGGTGGCTGATCAGAACCCGACTGA GCTACTGATCGATCCGACTGACGCTGGTGGCTGATCAGAACCCGACTGACCGCATGCCCGAARATCAAGATTTGCGGATCAGCACACCCGAGGCGCTGATGCGACCATCGCGCGCGGG GCTACTGATCGATCCGACTGACGCTGGTGGCTGATCAGAACCCGACTGA													
	2341	2350	2360	2370	2380	2390	2400	242#12						
gb-KF295828_1-NDM 16KP1 Consensus	CGGACTATGCGGGTTGGTGTCTTCCAGCGTCCGCCGTCGGTTACGTCGATGTCGCGGGCGCTTGA													

Anexo B: Identificación parcial de diferentes plásmidos en 16KP2 por medio del programa PlasmidFinder

PlasmidFinder Results

SETTINGS:
Selected %ID threshold: 95.00

PlasmidFinder - Enterobacteriaceae						
Plasmid	%identity	Query/HSP length	Contig	Position in contig	Note	Accession number
<i>FR</i>	100.00	230 / 230	contig_61	1928-2157	pKP91	CP000886
<i>A/C2</i>	100.00	417 / 417	contig_166	27485-27901		FN157004
<i>FIB(pKPH51)</i>	95.18	560 / 560	contig_133	35953-36512	pKPH51	CP000323

Input Files: *16kpn2_contigs.fasta*

Support
Scientific problems
Technical problems

Copyright DTU 2011 / All rights reserved
 Center for Genomic Epidemiology, DTU, Kemtorvet, Building 204, 2800 Kgs. Lyngby, Denmark
 Contact: Vibeke Dybdahl Hammer, Telephone: +45 3555 0420, E-mail: vdh@food.dtu.dk
 Funded by: The Danish Council for Strategic Research
 Last modified May 22, 2012 11:06:01 GMT

Bibliografía

1. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends Microbiol.* 2006 Sep;14(9):413-20.
2. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct;14(4):933-51, table of contents.
3. Bush K. The impact of beta-lactamases on the development of novel antimicrobial agents. *Curr Opin Investig Drugs.* 2002 Sep;3(9):1284-90.
4. Maltezou HC. Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *Int J Antimicrob Agents.* 2009 May;33(5):405 e1-7.
5. D'Andrea MM, Venturelli C, Giani T, Arena F, Conte V, Bresciani P, et al. Persistent carriage and infection by multidrug-resistant *Escherichia coli* ST405 producing NDM-1 carbapenemase: report on the first Italian cases. *J Clin Microbiol.* 2011 Jul;49(7):2755-8.
6. Saavedra SY CJS, Alvarez C, Cuervo SI, Olarte N, Escobar JA, Leal AL. Dissemination of a clone KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitals, Bogota, Colombia. *Austria Clinical Microbiology And Infection.* 2010;Supplement 16(:S361).
7. Kattan JN, Villegas MV, Quinn JP. New developments in carbapenems. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Dec;14(12):1102-11.
8. Danziger LH, Pendland SL. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics. *Am J Health Syst Pharm.* 1995 Mar 15;52(6 Suppl 2):S3-8.
9. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jul;20(3):440-58, table of contents.
10. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis.* 2011 May;11(5):381-93.
11. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980 May 16;289(1036):321-31.
12. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* [Case ReportsResearch Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Dec;53(12):5046-54.
13. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010 Sep;10(9):597-602.
14. Poirel L, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Feb;66(2):304-6.
15. Poirel L, Fortineau N, Nordmann P. International transfer of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from Iraq to France. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* [LetterResearch Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Apr;55(4):1821-2.
16. Poirel L, Hombrouck-Alet C, Freneaux C, Bernabeu S, Nordmann P. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. *Lancet Infect Dis.* 2010 Dec;10(12):832.

17. Sole M, Pitart C, Roca I, Fabrega A, Salvador P, Munoz L, et al. First description of an *Escherichia coli* strain producing NDM-1 carbapenemase in Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Sep;55(9):4402-4.
18. Bogaerts P, Bouchahrouf W, de Castro RR, Deplano A, Berhin C, Pierard D, et al. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Belgium. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Jun;55(6):3036-8.
19. Hrabak J, Stolbova M, Studentova V, Fridrichova M, Chudackova E, Zemlickova H. NDM-1 producing *Acinetobacter baumannii* isolated from a patient repatriated to the Czech Republic from Egypt, July 2011. *Euro Surveill*. 2012;17(7).
20. Jovicic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, et al. Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011 Aug;55(8):3929-31.
21. Ho PL, Lo WU, Yeung MK, Lin CH, Chow KH, Ang I, et al. Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong. *PLoS One*. 2011;6(3):e17989.
22. Savard P, Gopinath R, Zhu W, Kitchel B, Rasheed JK, Tekle T, et al. First NDM-positive *Salmonella* sp. strain identified in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011 Dec;55(12):5957-8.
23. Peirano G, Ahmed-Bentley J, Woodford N, Pitout JD. New Delhi metallo-beta-lactamase from traveler returning to Canada. *Emerg Infect Dis*. 2011 Feb;17(2):242-4.
24. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of blaOXA-23 with blaNDM-1 and arma in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010 Oct;65(10):2253-4.
25. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of blaNDM-1-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011 Nov;55(11):5403-7.
26. McGann P, Hang J, Clifford RJ, Yang Y, Kwak YI, Kuschner RA, et al. Complete sequence of a novel 178-kilobase plasmid carrying bla(NDM-1) in a *Providencia stuartii* strain isolated in Afghanistan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012 Apr;56(4):1673-9.
27. Espinal P, Fugazza G, Lopez Y, Kasma M, Lerman Y, Malhotra-Kumar S, et al. Dissemination of an NDM-2-producing *Acinetobacter baumannii* clone in an Israeli rehabilitation center. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011 Nov;55(11):5396-8.
28. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006 Aug;50(8):2880-2.
29. Mojica MF, Correa A, Vargas DA, Maya JJ, Montealegre MC, Rojas LJ, et al. Molecular correlates of the spread of KPC-producing *Enterobacteriaceae* in Colombia. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Sep;40(3):277-9.
30. Bonomo RA. New Delhi metallo-beta-lactamase and multidrug resistance: a global SOS? *Clin Infect Dis*. 2011 Feb 15;52(4):485-7.
31. Abdul Ghafur K. An obituary--on the death of antibiotics! *J Assoc Physicians India*. 2010 Mar;58:143-4.
32. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005 Apr;18(2):306-25.
33. Hirakata Y, Yamaguchi T, Nakano M, Izumikawa K, Mine M, Aoki S, et al. Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 2003 Jul 1;37(1):26-32.
34. Laupland KB, Parkins MD, Church DL, Gregson DB, Louie TJ, Conly JM, et al. Population-based epidemiological study of infections caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: importance of metallo-beta-lactamase (MBL)-producing strains. *J Infect Dis*. 2005 Nov 1;192(9):1606-12.
35. Poirel L, Lascols C, Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Mauritius. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012 Jan;56(1):598-9.

36. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011 Sep;55(9):4224-9.
37. Poirel L, Benouda A, Hays C, Nordmann P. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011 Dec;66(12):2781-3.
38. Pasteran F, Albornoz E, Faccone D, Gomez S, Valenzuela C, Morales M, et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012 Jul;67(7):1795-7.
39. Walsh TR, Toleman MA. The new medical challenge: why NDM-1? Why Indian? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011 Feb;9(2):137-41.
40. Leverstein-Van Hall MA, Stuart JC, Voets GM, Versteeg D, Tersmette T, Fluit AC. Global spread of New Delhi metallo-beta-lactamase 1. *Lancet Infect Dis*. 2010 Dec;10(12):830-1.
41. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol*. 2011 Dec;19(12):588-95.
42. Arnstein HR, Grant PT. The biosynthesis of penicillin. *Biochem J*. 1953 Jun 20;55(319th Meeting):v.
43. Matagne A, Lamotte-Brasseur J, Frere JM. Catalytic properties of class A beta-lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J*. 1998 Mar 1;330 (Pt 2):581-98.
44. Bodey GP. Penicillins, monobactams, and carbapenems. *Tex Heart Inst J*. 1990;17(4):315-29.
45. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol*. 2000 Oct;3(5):489-95.
46. Martinez MJ, Garcia MI, Sanchez EG, Sanchez JE. [Available carbapenems: Properties and differences]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010 Sep;28 Suppl 2:53-64.
47. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis*. 1988 Jul-Aug;10(4):677-8.
48. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995 Jun;39(6):1211-33.
49. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Nov;36 Suppl 3:S8-14.
50. Bonnin RA, Poirel L, Carattoli A, Nordmann P. Characterization of an *IncFII* plasmid encoding NDM-1 from *Escherichia coli* ST131. *PLoS One*. 2012;7(4):e34752.
51. Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, et al. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009 Aug;64(2):274-7.
52. Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, Queenan AM, Domenech-Sanchez A, Swenson JM, et al. Characterization of the extended-spectrum beta-lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000 Sep;44(9):2382-8.
53. Hudson CM BZ, Meagher RJ, Williams KP. Resistance Determinants and Mobile Genetic Elements of an NDM-1-Encoding *Klebsiella pneumoniae* Strain. *PLoS One*. 2014;9(6).
54. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement: CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013; 2013.
55. Yin-Ching C, Jer-Horng S, Ching-Nan L, Ming-Chung C. Cloning of a gene encoding a unique haemolysin from *Klebsiella pneumoniae* and its potential use as a species-specific gene probe. *Microb Pathog*. 2002 Jul;33(1):1-6.
56. Monstein HJ, Ostholm-Balkhed A, Nilsson MV, Nilsson M, Dornbusch K, Nilsson LE. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *blaSHV*, *blaTEM* and *blaCTX-M* genes in *Enterobacteriaceae*. *APMIS*. 2007 Dec;115(12):1400-8.
57. Poirel L, Walsh TR, Cu villier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 May;70(1):119-23.
58. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002 Jun;40(6):2153-62.

59. Roy Chowdhury P, Ingold A, Vanegas N, Martinez E, Merlino J, Merkier AK, et al. Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011 Jul;55(7):3140-9.
60. Arlet G, Rouveau M, Casin I, Bouvet PJ, Lagrange PH, Philippon A. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 beta-lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J Clin Microbiol*. 1994 Oct;32(10):2553-8.
61. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*. 2005 Aug;43(8):4178-82.
62. Schlesinger J, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Hammer-Münz O, Leavitt A, Gold HS, et al. Extended-Spectrum Beta-Lactamases among *Enterobacter* Isolates Obtained in Tel Aviv, Israel. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005 March 1, 2005;49(3):1150-6.
63. Takahashi S, Nagano Y. Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. *J Clin Microbiol*. 1984 Oct;20(4):608-13.
64. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*. 2005 Dec;63(3):219-28.
65. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem*. 1995 Apr 10;226(2):235-40.
66. Castanheira M, Pereira AS, Nicoletti AG, Pignatari AC, Barth AL, Gales AC. First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007 Apr;51(4):1527-9.
67. Jones LA, McIver CJ, Kim MJ, Rawlinson WD, White PA. The *aadB* gene cassette is associated with *blaSHV* genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005 Feb;49(2):794-7.
68. Diestra K, Miro E, Marti C, Navarro D, Cuquet J, Coll P, et al. Multiclonal epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Jul;17(7):1032-6.
69. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009 Apr;9(4):228-36.
70. Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009 Dec;30(12):1180-5.
71. Fraimow HS, Tsigrelis C. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: mechanisms, epidemiology, and management of specific resistant pathogens. *Crit Care Clin*. 2011 Jan;27(1):163-205.
72. Leung E, Weil DE, Raviglione M, Nakatani H. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ*. 2011 May 1;89(5):390-2.
73. Briceno DF, Correa A, Valencia C, Torres JA, Pacheco R, Montealegre MC, et al. [Antimicrobial resistance of Gram negative bacilli isolated from tertiary-care hospitals in Colombia]. *Biomedica*. 2010 Jul-Sep;30(3):371-81.
74. Lopez JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Briceno DF, et al. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Jan;17(1):52-6.
75. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect*. 2014 Feb;44(2):51-6.
76. Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol*. 2013;4:48.
77. Nordmann P, Couard JP, Sansot D, Poirel L. Emergence of an autochthonous and community-acquired NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Europe. *Clin Infect Dis*. 2012 Jan 1;54(1):150-1.
78. Kus JV, Tadros M, Simor A, Low DE, McGeer AJ, Willey BM, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase-1: local acquisition in Ontario, Canada, and challenges in detection. *CMAJ*. 2011 Aug 9;183(11):1257-61.

79. Gefen-Halevi S, Hindiye H, Ben-David D, Smollan G, Gal-Mor O, Azar R, et al. Isolation of genetically unrelated bla(NDM-1)-positive *Providencia rettgeri* strains in Israel. *J Clin Microbiol*. 2013 May;51(5):1642-3.
80. Dolejska M, Villa L, Dobiasova H, Fortini D, Feudi C, Carattoli A. Plasmid content of a clinically relevant *Klebsiella pneumoniae* clone from the Czech Republic producing CTX-M-15 and QnrB1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013 Feb;57(2):1073-6.
81. Chen YT, Lin AC, Siu LK, Koh TH. Sequence of closely related plasmids encoding bla(NDM-1) in two unrelated *Klebsiella pneumoniae* isolates in Singapore. *PLoS One*. 2012;7(11):e48737.
82. Balm MN, La MV, Krishnan P, Jureen R, Lin RT, Teo JW. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-type and OXA-181 carbapenemases. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Sep;19(9):E421-3.
83. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014 Apr 15.
84. Bushnell G, Mitrani-Gold F, Mundy LM. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase type 1-producing enterobacteriaceae and non-enterobacteriaceae: global case detection and bacterial surveillance. *Int J Infect Dis*. 2013 May;17(5):e325-33.
85. Sekizuka T, Matsui M, Yamane K, Takeuchi F, Ohnishi M, Hishinuma A, et al. Complete sequencing of the bla(NDM-1)-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS One*. 2011;6(9):e25334.
86. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol*. 2011 Dec;301(8):654-8.
87. Carattoli A, Villa L, Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Evolution of IncA/C blaCMY-(2)-carrying plasmids by acquisition of the blaNDM-(1) carbapenemase gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012 Feb;56(2):783-6.
88. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo-beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan;17(1):103-6.
89. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013 Aug;303(6-7):298-304.
90. Poirel L, Schrenzel J, Cherkaoui A, Bernabeu S, Renzi G, Nordmann P. Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011 Aug;66(8):1730-3.
91. Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, Nordmann P. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011 Feb;55(2):934-6.
92. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis*. 2011 May;11(5):355-62.
93. Baudry PJ, Mataseje L, Zhanel GG, Hoban DJ, Mulvey MR. Characterization of plasmids encoding CMY-2 AmpC beta-lactamases from *Escherichia coli* in Canadian intensive care units. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009 Dec;65(4):379-83.
94. Blanc V, Cortes P, Mesa RJ, Miro E, Navarro F, Llagostera M. Characterisation of plasmids encoding extended-spectrum beta-lactamase and CMY-2 in *Escherichia coli* isolated from animal farms. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Jan;31(1):76-8.
95. Call DR, Singer RS, Meng D, Broschat SL, Orfe LH, Anderson JM, et al. blaCMY-2-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010 Feb;54(2):590-6.
96. Daniels JB, Call DR, Besser TE. Molecular epidemiology of blaCMY-2 plasmids carried by *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from cattle in the Pacific Northwest. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Dec;73(24):8005-11.
97. Winokur PL, Vonstein DL, Hoffman LJ, Uhlenhopp EK, Doern GV. Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001 Oct;45(10):2716-22.

98. Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, White DG, Rosso ML, Rasko DA, et al. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One*. 2007;2(3):e309.
99. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Sep;3(9):711-21.
100. Di Nocera PP, Rocco F, Giannouli M, Triassi M, Zarrilli R. Genome organization of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains. *BMC Microbiol*. 2011;11:224.
101. Partridge SR, Iredell JR. Genetic contexts of *bla*NDM-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012 Nov;56(11):6065-7; author reply 71.
102. Dortet L, Nordmann P, Poirel L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012 Apr;56(4):1693-7.
103. Janvier F, Jeannot K, Tesse S, Robert-Nicoud M, Delacour H, Rapp C, et al. Molecular characterization of *bla*NDM-1 in a sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolate from France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013 Jul;57(7):3408-11.