



**Evaluación del comportamiento de la actividad
enzimática de la carbapenemasa *KPC* en aislamientos de
Pseudomonas aeruginosa por medio de cromatografía
líquida de alta resolución (HPLC)**

Zulybeth Andrea Duque Poveda

**Universidad El Bosque
Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica
Bogotá DC. – Octubre 2023**

Evaluación del comportamiento de la actividad enzimática de la carbapenemasa *KPC* en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Zulybeth Andrea Duque Poveda

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

Químico Farmacéutico

Investigación Aplicada

Director

Javier Escobar Perez

Codirectora

Zayda Lorena Corredor Rozo

Caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias.

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica

Bogotá DC. – Octubre 2023

Hoja de identificación

Título:	Evaluación del comportamiento de la actividad enzimática de la carbapenemasa <i>KPC</i> en aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
Grupo de investigación:	Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana
Línea de Investigación:	Caracterización molecular de los mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias
Institución (es) Participante (s):	Universidad El Bosque
Tipo de Investigación:	Investigación Aplicada
Estudiante:	Zulybeth Andrea Duque Poveda
Director:	Javier Antonio Escobar Pérez
Codirector:	Zayda Lorena Corredor Roza
Asesor:	N/A

Dedicatoria

Dedico esta tesis al que nunca soltó mi mano y siempre me levantó, al que me mostró esa luz de esperanza que necesitaba en cada ensayo, al que me colocó en el lugar correcto con las personas que serían mi apoyo y me darían la orientación, y al que le debo mi vida entera por todas las bendiciones que me son otorgadas, toda la Gloria, mi honra y mis triunfos, son para ti mi amado señor. VCR

Agradecimientos

Inicialmente agradezco a Dios por regalarme la sabiduría y el conocimiento para poder llevar a cabalidad este proyecto, por colocarme en el camino a las personas correctas que aportarían de manera cognitiva y personal al desarrollo de este, por hacerme tan fuerte y valiente de poder sobrellevar cualquier adversidad que se me presentara.

A mi amada madre, Andrea Poveda, por su enorme esfuerzo para hacer de mí una profesional íntegra, por darme el mejor de los ejemplos, por su amor, por su motivación, porque nunca ha soltado mi mano y especialmente, porque sin sus oraciones y su apoyo no habría llegado hasta aquí.

A mis amigos por ayudarme en cualquier percance y darme siempre las palabras que necesitaba en los momentos de desolación, por recordarme que debía comer, por cuidarme, por ser mi soporte en cada ensayo fallido, por brindarme posibles soluciones ante los infortunios presentados, porque nunca dejaron de creer en mí, en que lo iba a lograr, y en lo exitosa que sería en un futuro; son el regalo más lindo que Dios pudo darme como su hija favorita.

Al programa de Química Farmacéutica de la Universidad El Bosque por el préstamo de los equipos, especialmente al Docente James Guevara por su tiempo y dedicación en los ensayos con el equipo HPLC.

Al Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana, a todos los integrantes del grupo, por el apoyo, y la ayuda generada, especialmente, a mis tutores Javier Escobar y Zayda Corredor.

“Nada en la vida debe ser temido, solo entendido. Ahora es el momento de entender más, para temer menos”.

Marie Curie.

Tabla de contenido

1	Introducción	1
2	Marco teórico	2
2.1	Modelo de estudio: Pseudomona aeruginosa	2
2.1.1	Características genómicas de Pseudomona aeruginosa	2
2.1.2.	Mecanismos de resistencia de Pseudomona aeruginosa a los Carbapenémicos	2
2.2	Impacto de las carbapenemasas en contexto clínico.....	3
2.2.1	Clasificación de las carbapenemasas	3
2.3.	Plataformas genéticas móviles.....	4
2.3.1	Transposones	4
2.3.2	Plásmidos	4
2.4	Opciones terapéuticas.....	5
2.4.1	Antibióticos	5
2.5	Cinética enzimática	7
2.5.1	Ecuación de Michaelis-Menten	7
2.5.2	Cinética enzimática de KPC con Meropenem	8
2.5.3	Linealización de Lineweaver-Burk	8
2.6	Técnicas de evaluación de actividad enzimática.....	8
2.6.1	Espectrofotometría	9
2.6.2	Cromatografía	9
3	Planteamiento del problema	10
4	Pregunta de investigación	11
5	Objetivos	12
5.1	Objetivo general	12
5.2	Objetivos específicos.....	12
5.2.1	Determinar las diferencias en la actividad enzimática de la enzima KPC usando extractos de proteínas y bacteria total.	12
5.2.2	Establecer las condiciones óptimas de cuantificación del meropenem por medio de HPLC.	12
5.2.3	Evaluar las diferencias en la actividad enzimática de aislamientos clínicos de Pseudomonas aeruginosa productoras de carbapenemasa KPC.....	12
6	Metodología	13

6.1	Aislamientos bacterianos de estudio	13
6.2	Determinación de las diferencias en la actividad enzimática de la enzima KPC usando extractos de proteínas y bacteria total.	14
6.2.1	Crecimiento bacteriano y extracción de DNA	14
6.2.2	Confirmación molecular de género y especie de los aislamientos	15
6.2.3	Confirmación molecular de la presencia del gen blaKPC	16
6.2.4	Extracción de proteína con B-PER ®	17
6.3	Establecimiento de las condiciones óptimas de cuantificación del meropenem por medio de HPLC	17
6.3.1	Curva de calibración con MER™ en espectrofotómetro y M2574-50mg en HPLC.....	18
6.3.2	Reacción enzimática con MER™ y M2574-50mg en espectrofotómetro y HPLC con bacteria total y proteína.....	19
6.4	Evaluación de las diferencias en la actividad enzimática de aislamientos clínicos de Pseudomonas aeruginosa productoras de carbapenemasa KPC.	22
7	Resultados y análisis de resultados.....	23
7.1	Determinación de las diferencias en la actividad enzimática de la enzima KPC usando	23
7.1.1	Crecimiento bacteriano y extracción de DNA	23
7.1.2	Confirmación molecular de género y especie de los aislamientos	24
7.1.3	Confirmación molecular de la presencia del gen blaKPC	25
7.1.4	Extracción de proteína con B-PER ®	26
7.2	Establecer las condiciones óptimas de cuantificación del meropenem por medio de HPLC	27
7.2.1	Curva de calibración con MER™ en espectrofotómetro y M2574-50mg en HPLC.....	27
7.2.2	Reacción enzimática con MER™ y M2574-50mg en espectrofotómetro y HPLC con bacteria total y proteína.....	31
7.3	Evaluación de las diferencias en la actividad enzimática de aislamientos clínicos de Pseudomonas aeruginosa productoras de carbapenemasa KPC.	37
8	Conclusiones.....	39
9	Anexos	40
10	Recomendaciones	41
11	Referencias bibliográficas	42

Listado de tablas

		Pág.
Tabla 1	<i>Parámetros cinéticos de las variantes de KPC</i>	8
Tabla 2	<i>Características genéticas de los aislamientos y cepas de Pseudomonas aeruginosa que se utilizarán en el estudio</i>	13
Tabla 3	<i>Composición química en g/L del agar y caldo BHI a pH 7,4 $\pm$ 0,2 a 25°C</i>	15
Tabla 4	<i>Condiciones, iniciadores y productos para cada uno de los aislamientos a amplificar</i>	16
Tabla 5	<i>Condiciones, iniciadores y productos para el gen KPC</i>	17
Tabla 6	<i>Componentes de la matriz de cada tratamiento para la lectura en espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 10S UV-VIS).</i>	18
Tabla 7	<i>Componentes de la matriz de cada tratamiento para la lectura en HPLC</i>	19
Tabla 8	<i>Componentes de la matriz de cada tratamiento para los ensayos de reacción enzimática con bacteria total en el espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 10S UV-VIS).</i>	20
Tabla 9	<i>Componentes de la matriz de cada tratamiento para los ensayos de reacción enzimática con extracto proteico en el espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 10S UV-VIS).</i>	21
Tabla 10	<i>Componentes de la matriz de cada tratamiento para los ensayos de reacción enzimática con extracto proteico en HPLC</i>	21
Tabla 11	<i>Ecuaciones para calcular la actividad enzimática a partir de los inversos</i>	22
Tabla 12	<i>Cuantificación y Verificación de la calidad de la extracción de ADN</i>	24
Tabla 13	<i>Cuantificación y Verificación de la calidad de la extracción de proteínas</i>	27
Tabla 14	<i>Datos del MER TM en el espectrofotómetro a λ 280 nm</i>	28
Tabla 15	<i>Datos del M2574-50mg en el HPLC a λ 280 nm</i>	30
Tabla 16	<i>Comparación de las constantes obtenidas de Michaelis-Menten con respecto a lo reportado en literatura.</i>	36

Listado de figuras

		Pág.
Figura 1	<i>Reacción de hidrólisis del sustrato MER con la enzima serina-β-lactamasa</i>	7
Figura 2	<i>Electroforesis: Gel de agarosa al 1,5% en buffer TBE 0,5X, 100V por 1 hora. Marcador de peso molecular 50 pb DNA Ladder (Thermo Scientific) (1). Control de reactivos (2). Control negativo: P. mirabilis (3). Controles positivos: E.coli ATCC 25922 (4), 24Kpn119 (5), 29Pae05 (6). Muestras: E.coli (7), Kpn ATCC BAA 2146 (8) 24Pae112 (9), 34Pae8 (10), 34Pe23 (11), 34Pae36 (12), 30Pae2 (13) Pa01 (14) y 21Kpn34 (15)</i>	25
Figura 3	<i>Electroforesis: Gel de agarosa al 1,5% en buffer TBE 0,5X, 100V por 1 hora. Marcador de peso molecular 50 pb DNA Ladder (Thermo Scientific) (1). Control de reactivos (2). Control positivo: Kpn ATCC BAA 2146 (3). Control negativo: E.coli ATCC 25922 (4). Muestras: 24Pae112 (5), 34Pae8 (6), 34Pe23 (7), 34Pae36 (8), 30Pae2 (9) Pa01 (10) y 21Kpn34 (11)</i>	26
Figura 4	<i>Curva de calibración del MER™ en el espectrofotómetro λ 280 nm</i>	28
Figura 5	<i>Curva de calibración del M2574-50mg en el HPLC a λ 280 nm</i>	30
Figura 6	<i>Reacción enzimática con 30 µg/mL MER™ y 9x10⁸ UFC de cada uno de los aislamientos clínicos. Las barras verticales sobre las columnas indican la desviación estándar n=3; las diferencias estadísticas significativas se hicieron según la prueba Tukey (P<0,05)</i>	32
Figura 7	<i>Reacción enzimática con 30 µg/mL MER™ y 9x10⁸ UFC de cada uno de los aislamientos clínicos.</i>	33
Figura 8	<i>Reacción enzimática con 30 µg/mL MER™ y 2 mg de extracto proteico de cada uno de los aislamientos clínicos. Cada punto es el promedio de tres repeticiones, y las barras de error muestran la desviación estándar n=3. Las diferencias estadísticas significativas se hicieron según la prueba Tukey (P<0,05)</i>	33
Figura 9	<i>Reacción enzimática con M2574-50mg y 2 mg de proteína de cada uno de los aislamientos clínicos.</i>	34
Figura 10	<i>Reacción enzimática con 80 µg/mL M2574-50mg y 2 mg de extracto proteico de cada uno de los aislamientos clínicos. Las diferencias estadísticas significativas se hicieron según la prueba Tukey (P<0,05)</i>	35

Figura 11	Gráfico de Michaelis-Menten para la enzima KPC presente en cada uno de los aislamientos	37
-----------	---	----

Lista de Símbolos y abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico	Km	Constante de Michaelis-Menten
ARN	Ácido ribonucleico	KPC	Carbapenemasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (por sus siglas en inglés)
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (por sus siglas en inglés)	Kpn	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
BHI	Infusión Cerebro Corazón (por sus siglas en inglés)	K. pneumoniae	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
bla	β -lactamasa	LGMB	Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana
B-PER ®	Bacterial Protein Extraction Reagent	mAU	mili-Unidades de Absorbancia
CAZ	Ceftazidima	Mb	Megabases
DDE	Destilada desionizada estéril	MER	Meropenem
E.coli	<i>Escherichia coli</i>	OD	Densidad óptica (por sus siglas en inglés)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	P. aeruginosa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EGM	Elementos genéticos móviles	Pb	Pares de bases
EMA	Agencia Europea de Medicamentos	PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
FM	Fase móvil	Ser	Serina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (por sus siglas en inglés)	Tr	Tiempo de retención

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, no fermentadora de la lactosa, aerobio de tipo facultativo (1). Es bastante persistente en el ambiente, puede llegar a adaptarse de manera eficaz en el agua y en el suelo, viviendo con requerimientos nutricionales mínimos y tolerando diversas condiciones físicas. Es considerada un patógeno oportunista, generando infecciones en los humanos que si no son tratadas a tiempo pueden ser mortales, con resistencia natural a varias familias de antibióticos y una extraordinaria capacidad de generar y adquirir diversos mecanismos de resistencia, entre ellos las carbapenemasas, enzimas con actividad para degradar los antibióticos carbapenémicos (pertenecientes a los β -lactámicos) usados como último recurso frente a la “multirresistencia extrema” de las bacterias. En Colombia fue reportado por primera vez un aislamiento de *P. aeruginosa* portadora de la enzima *KPC* (2) (EC 3.5.2.6) (3) una potente carbapenemasa capaz de hidrolizar los carbapenémicos y la mayoría de los antibióticos β -lactámicos. Actualmente, esta enzima es la más frecuente en aislamientos resistentes a los carbapenémicos, lo cual podría sugerir su eficiente capacidad de hidrólisis. Por tal razón, el objetivo de este proyecto es evaluar el comportamiento de la actividad enzimática de *KPC* en el proceso de hidrólisis de antibióticos carbapenémicos en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Las muestras fueron facilitadas y/o recuperadas de instituciones de salud colombianas, estos aislamientos (24Pae112, 34Pae8, 34Pae23, 34Pae36, 30Pae2) fueron sometidos a pruebas de confirmación de especie y de presencia del gen que codifica para *KPC* por medio de técnicas moleculares como PCR. Posteriormente, por medio del espectrofotómetro, se evaluó la capacidad de hidrólisis de cada uno de los aislamientos; para esto, se realizaron ensayos de reacción enzimática con 30 $\mu\text{g/mL}$ de *MER* [™] y 9×10^8 UFC de bacteria total a 37°C y después de 10 minutos de reacción hubo una reducción gradual del sustrato en orden cero, en un rango del 20%-50% con diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre cada uno de los aislamientos. A su vez, se evaluó este comportamiento con extracto proteico en espectrofotómetro y se evidenció que después de 18 minutos de reacción a temperatura ambiente, con 30 $\mu\text{g/mL}$ de *MER* [™] y 2 mg de proteína, hubo una degradación gradual del sustrato en orden cero, en un rango del 77%-98%. Teniendo en cuenta lo obtenido previamente, y entendiendo que la técnica de cromatografía permite cuantificar a un límite de detección bajo (en el orden de μg), se realizó la medición en el equipo HPLC partiendo de 80 $\mu\text{g/mL}$ de M2574-50mg y 2 mg de proteína, obteniéndose una reducción del 51%-99% del sustrato inicial; en ambos equipos se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre cada uno de los

aislamientos. De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que los aislamientos evaluados presentaron una notable capacidad de hidrólisis del sustrato y que los ensayos tanto con bacterias totales como con extracto proteico revelaron reducciones significativas en orden cero, con un rango de reducción que oscila entre el 20% y el 98%, lo que sugiere una eficaz actividad enzimática por parte de *KPC*. Además, la cuantificación que se llevó a cabo por medio de las dos técnicas empleadas mostró una reducción considerable del sustrato, respaldando aún más la actividad enzimática observada. Estos resultados subrayan la importancia de comprender la actividad de la enzima y tienen implicaciones significativas en el contexto de la resistencia antimicrobiana y la evaluación de nuevos compuestos farmacológicos

Palabras Clave: *Pseudomona aeruginosa, KPC, actividad enzimática, resistencia antimicrobiana, antibióticos β -lactámicos, antibióticos carbapenémicos, HPLC.*

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative, non-lactose-fermenting, facultative aerobic bacteria (1). It is quite persistent in the environment, can adapt effectively in water and soil, living with minimal nutritional requirements and tolerating diverse physical conditions. It is considered an opportunistic pathogen, generating infections in humans that if not treated in time can be fatal, with natural resistance to several families of antibiotics and an extraordinary ability to generate and acquire various resistance mechanisms, including carbapenemases, enzymes with activity to degrade carbapenem antibiotics (belonging to the β -lactams) used as a last resort against the "extreme multi-resistance" of bacteria. In Colombia, an isolate of *P. aeruginosa* carrying the *KPC* enzyme (2) (EC 3.5.2.6) (3), a potent carbapenemase capable of hydrolyzing carbapenemics and most β -lactam antibiotics, was reported for the first time. Currently, this enzyme is the most frequent in carbapenem-resistant isolates, which could suggest its efficient hydrolysis capacity. For this reason, the purpose of this project is to evaluate the behavior of the enzymatic activity of *KPC* in the hydrolysis process of carbapenem antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates by high performance liquid chromatography (HPLC).

These isolates (24Pae112, 34Pae8, 34Pae23, 34Pae23, 34Pae36, 30Pae2) were tested for species confirmation and for the presence of the gene coding for *KPC* by means of molecular techniques such as PCR. Subsequently, by means of the spectrophotometer, the hydrolysis capacity of each of the isolates was evaluated; for this, enzymatic reaction assays were performed with 30 $\mu\text{g/mL}$ of MER TM and 9×10^8 CFU of total bacteria at 37°C and after 10 minutes of reaction there was a gradual reduction of the substrate in zero order, in a range of 20%-50% with significant statistical differences ($P < 0.05$) between each of the isolates. In turn, this behavior was evaluated with protein extract in spectrophotometer, and it was evidenced that after 18 minutes of reaction at room temperature, with 30 $\mu\text{g/mL}$ of MER TM and 2 mg of protein, there was a gradual degradation of the substrate in zero order, in a range of 77%-98%. Taking into account what was previously obtained, and understanding that the chromatography technique allows quantification at a low detection limit (in the order of μg), the measurement was performed in the HPLC equipment starting from 80 $\mu\text{g/mL}$ of M2574-50mg and 2 mg of protein, obtaining a reduction of 51%-99% of the initial substrate; in both equipment's significant statistical differences ($P < 0.05$) were presented between each of the isolates. According to the results obtained, it is concluded that the isolates evaluated presented a remarkable substrate hydrolysis capacity and that the assays with both total bacteria and protein extract revealed significant reductions in zero order, with a reduction range between 20% and 98%, suggesting an efficient enzymatic activity by *KPC*.

In addition, quantification carried out by the two techniques employed showed considerable substrate reduction, further supporting the observed enzymatic activity. These results underscore the importance of understanding enzyme activity and have significant implications in the context of antimicrobial resistance and the evaluation of new pharmacological compounds.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, KPC, enzymatic activity, antimicrobial resistance, β -lactam antibiotics, carbapenem antibiotics, HPLC

1 Introducción

Actualmente, la resistencia antimicrobiana es un desafío creciente y alarmante, en el campo de la microbiología y la salud pública, que afecta la efectividad de los tratamientos médicos en todo el mundo. Uno de los microorganismos más preocupantes en términos de resistencia antimicrobiana es *P. aeruginosa*, un género de bacterias conocidas por su versatilidad y adaptabilidad en cualquier tipo de medio, caracterizadas por su capacidad para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, lo que las convierte en una amenaza significativa en entornos clínicos y hospitalarios, en casos como las neumonías, las infecciones del tracto urinario, y las infecciones en pacientes inmunocomprometidos como aquellos con cáncer neutropénico, quemaduras y SIDA (4). Esta resistencia se manifiesta a través de diversas estrategias, como la producción de enzimas β -lactamasas, bombas de eflujo y modificaciones de las membranas celulares, que disminuyen la efectividad de los antibióticos (5).

Por tal razón, en el presente trabajo se evalúa el comportamiento de la actividad enzimática de la carbapenemasa *KPC* en el proceso de hidrólisis de antibióticos carbapenémicos en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y a partir de esto, entender las implicaciones para la salud pública y las estrategias necesarias para abordar este desafío emergente; en donde lo que se esperaba obtener es que la enzima *KPC* hidroliza el sustrato (MER) de forma eficiente y con velocidades variables en los diferentes aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*, estas diferencias son producidas probablemente por algunas características genéticas específicas del gen en cada aislamiento (localización, número de copias y background genético).

2 Marco teórico

2.1 Modelo de estudio: *Pseudomona aeruginosa*

Es una bacteria Gram negativa, con forma de bacilo (tamaño de 0,5 a 3,0 μm), no fermentadora de la lactosa, aerobio de tipo facultativo (4) es decir, que presenta la capacidad de crecer en medios anaerobios, tomando el nitrógeno o la arginina como aceptor de protones, y móvil por la síntesis de un flagelo polar (5). Es bastante persistente en el ambiente, puede llegar a adaptarse de manera eficaz en el agua y en el suelo, viviendo con requerimientos nutricionales mínimos y tolerando diversas condiciones físicas (5) soportando hasta los 50°C y teniendo un coeficiente de actividad de agua del 0,95 (6)(7) es por ello que es considerada un patógeno oportunista, generando infecciones en los humanos que si no son tratadas a tiempo pueden ser mortales (8) con resistencia natural a varias familias de antibióticos y una extraordinaria capacidad de generar y adquirir diversos mecanismos de resistencia, entre ellos las carbapenemasas.

2.1.1 Características genómicas de *Pseudomona aeruginosa*

El genoma de *P. aeruginosa* es altamente versátil, complejo, de tipo lineal y relativamente grande, con alrededor de 5.5 a 7 millones de pb (Mb) en su ADN, produciendo una gran capacidad genética y que experimente procesos de recombinación y reorganización genómica (4); además de que presenta una alta plasticidad, lo que significa que puede adaptarse rápidamente a diferentes entornos y condiciones (9) esto se debe a su capacidad para adquirir y perder genes de forma eficiente a través de procesos de transferencia horizontal de genes, como la conjugación, la transformación y la transducción (10).

2.1.2. Mecanismos de resistencia de *Pseudomona aeruginosa* a los Carbapenémicos

P. aeruginosa es conocida por su capacidad para desarrollar resistencia a múltiples clases de antibióticos que la protegen del ataque de los antibióticos y del sistema inmunológico (4,11) . Esto se debe a: 1. Presencia de genes de resistencia, debido a su alta variabilidad genética; 2. Bombas de eflujo, que son proteínas de transporte que expulsan aquellas sustancias nocivas para la bacteria, disminuyendo así la concentración intracelular del antibiótico (12); 3. Las modificaciones en las dianas terapéuticas, como las proteínas de unión a penicilina (PBPs) diana, para reducir la afinidad de los antibióticos y evitar su acción (13); 4. Alteraciones que provoca en las porinas, conllevando a una disminución de la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria y con ello, una reducción en la absorción (14); 5. Capacidad para formar biofilms; 6) Producción de β -

lactamasas, como las *KPC* (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), las metalo- β -lactamasas, como las IMP y las VIM (15).

2.2 Impacto de las carbapenemasas en contexto clínico

Las carbapenemasas son enzimas que hidrolizan los antibióticos carbapenémicos, como el imipenem y el meropenem (4) impidiendo que ejerzan su acción y limitando seriamente las opciones de tratamiento para infecciones causadas por bacterias que producen estas enzimas, conllevando a un prolongamiento en las estancias hospitalarias o que incluso, sea ineficiente, aumentando la morbilidad (16,17). Es por esto que el control y la vigilancia son esenciales para prevenir y limitar la propagación de carbapenemasas en entornos de atención médica (18) esto incluye prácticas de higiene adecuadas, diagnóstico temprano, aislamiento de pacientes infectados y medidas de control de infecciones.

2.2.1 Clasificación de las carbapenemasas

Las carbapenemasas se han clasificado en diferentes grupos o clases en función de sus características estructurales y de secuencia (19). Estas enzimas tienen dos sistemas de nomenclatura: la primera es la clasificación molecular de Ambler y la segunda la funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (20). Para efectos de este documento se trabajó con la nomenclatura Ambler, la cual tiene en cuenta tanto la secuencia proteica como su sustrato; se clasifica en cuatro tipos (A, B, C y D) según su homología en la secuencia proteica, siendo de interés para la investigación las de clase A.

2.2.1.1 Clase A y D

Las carbapenemasas de esta clase son enzimas de tipo serina- β -lactamasas que se caracterizan por tener este aminoácido (serina) en su sitio activo y que, además, no son inhibidas por EDTA (21); sin embargo, las de clase D se conocen como OXA (oxacilinaasa) y originalmente no eran carbapenemasas, algunas variantes de las OXA han adquirido la capacidad de hidrolizar carbapenémicos (22). Dentro de esta clasificación se encuentran las *KPC* (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), que son unas de las más preocupantes debido a su capacidad de hidrolizar una amplia gama de carbapenémicos (23); estas a su vez se subclasifican en:

- **KPC-2:** Es una de las variantes más comunes de *KPC*. Se ha encontrado en diversas regiones del mundo y se ha asociado con la resistencia a los carbapenémicos en cepas de *Klebsiella pneumoniae* e incluso, se ha demostrado que puede desempeñar un papel

en la capacidad de *P. aeruginosa* para exhibir plasticidad genómica y adaptarse a diferentes condiciones (24).

- **KPC-3:** Es otra variante importante que se ha identificado en cepas de *Klebsiella pneumoniae* y otras bacterias Gram negativas. Al igual que KPC-2, tiene la capacidad de hidrolizar carbapenémicos.

2.3. Plataformas genéticas móviles

Son fragmentos de ADN que pueden moverse de manera independiente dentro de un genoma o entre genomas de la misma especie, incluso, por medio de la transferencia horizontal, entre especies diferentes (25). Esto va a depender de la cercanía que exista entre la célula donante y la receptora, además de ciertos elementos que pueden facilitar su transferencia o movimiento dentro de la misma. Existen diferentes tipos de elementos genéticos móviles (EGM), dentro de los cuales se encuentran los transposones, plásmidos, integrones, bacteriófagos, y los plásmidos integrativos y conjugativos; sin embargo, para efectos de la investigación, solo fueron de interés los plásmidos y los transposones.

2.3.1 Transposones

Los transposones son secuencias de ADN que pueden moverse dentro del genoma de una localización a otra por medio de una transposasa y causar cambios en la organización genética (26), estos a su vez se clasifican en simples o complejos; los transposones simples son secuencias de inserción (SI) flanqueadas entre secuencias cortas invertidas repetidas (IR), no poseen genes de resistencia a antibióticos (27), pero pueden contribuir a la resistencia moderando la expresión, movilización o inactivación de genes contiguos; por el contrario, los transposones complejos pueden movilizar genes de resistencia a antibióticos y son flanqueados por dos secuencias de inserción separadas no siempre idénticas (27).

2.3.2 Plásmidos

Son pequeñas moléculas de ADN circular de doble cadena que existen de forma independiente del cromosoma y pueden autorreplicarse y transferirse entre bacterias. Los plásmidos a menudo portan genes que proporcionan ventajas adaptativas de virulencia o resistencia (28). Existen plásmidos de resistencia conjugativos y movilizables, los primeros codifican la maquinaria necesaria para promover su propia transferencia de célula a célula por medio del sistema de secreción de tipo IV; por el contrario, los plásmidos movilizables necesitan la colaboración de un plásmido conjugativo para su transferencia, por lo cual tienden a ser más pequeños (29). El

tamaño de los plásmidos movilizables a menudo es 10 Kb, a diferencia de los plásmidos conjugativos cuyo tamaño es de aproximadamente 30 Kb o más (30)

2.4 Opciones terapéuticas

El tratamiento de las infecciones bacterianas se basa en el uso de antibióticos y puede variar según el tipo de bacteria y la gravedad de la infección.

2.4.1 Antibióticos

Son sustancias químicas producidas por un ser vivo o un derivado sintético, con el fin de erradicar, impedir el crecimiento o multiplicación de ciertas clases de microorganismos sensibles (30). Existen diversos tipos de antibióticos que actúan sobre diferentes aspectos de la estructura o la función bacteriana, y se clasifican en los siguientes grupos:

2.4.1.1 Antibióticos de amplio espectro

Son antibióticos efectivos contra una amplia gama de bacterias y se utilizan cuando no se conoce la causa exacta de la infección o cuando se sospecha una infección grave (31).

2.4.1.2 Antibióticos de estrecho espectro

Son antibióticos específicos para ciertas bacterias y se utilizan cuando se conoce la bacteria causante de la infección (31).

2.4.1.3 Antibióticos de última línea

En casos de infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples antibióticos, se pueden utilizar antibióticos de último recurso, como los carbapenémicos o la colistina (31).

2.4.1.3.1 Carbapenémicos

Los carbapenémicos son una subclase de antibióticos llamados antibióticos β -lactámicos (antibióticos que tienen dentro de su estructura química un anillo β -lactámico) (32). Son de amplio espectro, es decir, son eficaces frente a muchos tipos de bacterias, incluyendo aquellas que son resistentes a otros antibióticos. Dentro de este grupo se encuentran: Doripenem, Ertapenem, Imipenem y Meropenem.

2.4.1.3.1 Meropenem

Es un antibiótico carbapenémico de amplio espectro, es decir, es activo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas como *P. aeruginosa* (33). Dentro de su farmacología se tiene la siguiente información:

- **Mecanismo de acción:** La actividad bactericida del MER es consecuencia de la inhibición de la síntesis de la pared celular y de componentes vitales de la misma, conllevando a la muerte de la bacteria. Esto sucede gracias a que ingresa fácilmente en la mayoría de las bacterias Gram positivas y Gram negativas para alcanzar los objetivos de la proteína fijadora de penicilina (PBP-2, PBP-3 y PBP-4) de *E. coli* y *P. aeruginosa* (34).
- **Indicaciones Clínicas:** El MER se utiliza para el tratamiento de diversas infecciones, incluyendo infecciones del tracto respiratorio, infecciones urinarias, infecciones intraabdominales, infecciones de la piel y tejidos blandos, sepsis y meningitis bacteriana (35).
- **Mecanismo de resistencia:** Véase el apartado “2.1.2 Mecanismos de resistencia de *Pseudomona aeruginosa* a los Carbapenémicos” del presente documento.
- **Propiedades fisicoquímicas:** El MER es altamente soluble en agua, lo que facilita su formulación para su administración intravenosa o intramuscular, además de que garantiza la disponibilidad del medicamento en el torrente sanguíneo y su distribución en el organismo; es una molécula bastante hidrófila (35) con valores del logaritmo de la relación de reparto n-octanol/agua (logP) de -4.4; presenta en su estructura un grupo carboxilo con un valor de pKa de 3,5; además, es relativamente estable en soluciones acuosas a temperatura ambiente (35). Sin embargo, es sensible a la degradación en presencia de iones metálicos divalentes, como calcio y magnesio.
- **Reacción enzimática:** El MER tiene un anillo de tiazolidina de cinco miembros fusionado a un anillo de β -lactámico de cuatro miembros; este último anillo está tenso e incluye un grupo amida que desempeña un papel fundamental en la inactivación de la síntesis de peptidoglicano. El ataque a la fracción amida del anillo de β -lactama por un sitio activo de transpeptidasa se da como resultado una acil enzima covalente, provocando que el antibiótico se hidrolice muy lento, y se genere la formación de manera irreversible de aductos, véase la Figura 1 (36).

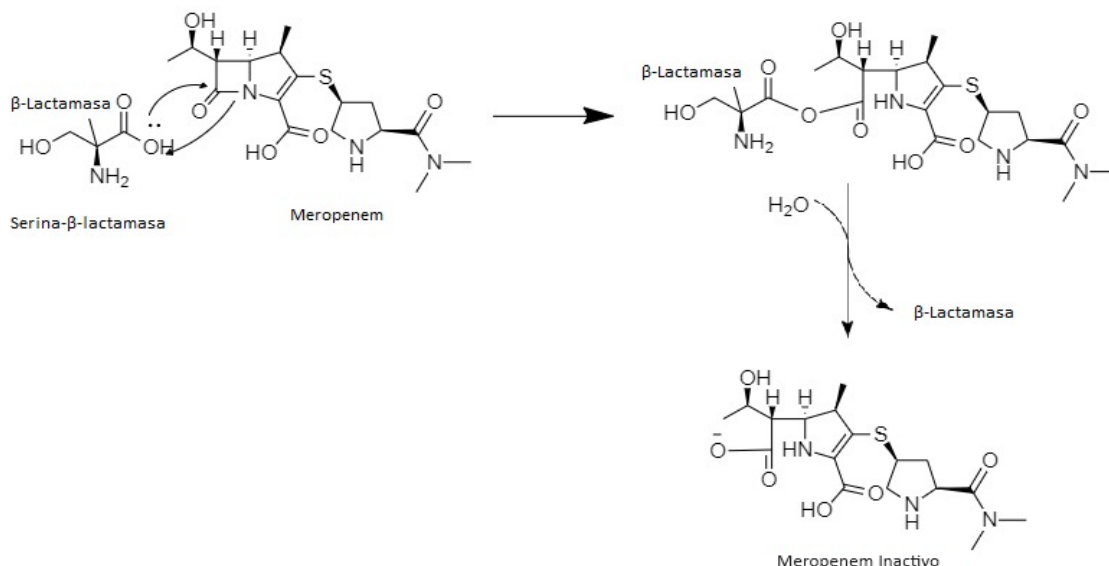


Figura 1. Reacción de hidrólisis del sustrato MER con la enzima serina-β-lactamasa

2.5 Cinética enzimática

La cinética enzimática es una rama de la bioquímica que se basa en el estudio de las velocidades de reacción enzimática y cómo éstas van cambiando en función de la concentración de sustrato, la temperatura, el pH y otros factores (37) esto implica determinar parámetros cinéticos como:

1. La constante de Michaelis-Menten (K_m) (38), que representa la concentración de sustrato a la mitad de la velocidad máxima (V_{max}) y a su vez, refleja la afinidad de la enzima por su sustrato; un valor bajo de K_m ($< 1 \text{ mM}$) (36), indica una alta afinidad de la enzima por el sustrato;
- 2) la velocidad máxima (V_{max})(36), que representa la máxima velocidad de la reacción enzimática, y la máxima capacidad de la enzima para catalizar la reacción;
- 3) el estudio de inhibidores y reguladores de la enzima (36), con el fin de entender su comportamiento, cómo se une a su sustrato y cómo cataliza la conversión de sustrato en producto (39).

2.5.1 Ecuación de Michaelis-Menten

La ecuación de Michaelis-Menten es una declaración de la relación cuantitativa entre la velocidad inicial (V_0), la velocidad máxima (V_{max}) y la concentración inicial de sustrato $[S]$ (36).

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

- V_0 es la velocidad de la reacción enzimática.
- V_{max} es la velocidad máxima, que representa la velocidad de la reacción cuando la enzima está completamente saturada de sustrato.
- $[S]$ es la concentración del sustrato.

- K_m es la constante de Michaelis-Menten, que es la concentración de sustrato a la que la velocidad de reacción es la mitad de V_{max} ; se expresa en unidades de concentración molar.

2.5.2 Cinética enzimática de KPC con Meropenem

El mecanismo de acción de las carbapenemasas, incluida la *KPC*, implica la hidrólisis de los enlaces de los carbapenémicos, conllevando a una inactivación en su función farmacológica; la velocidad de esta reacción enzimática depende de varios factores, incluyendo la concentración del sustrato (MER) presente, la concentración de la enzima *KPC* y las condiciones específicas del entorno (como el pH y la temperatura); sin embargo, se ha reportado en literatura, valores aproximados de las constantes enzimáticas para algunas variantes de *KPC* frente al MER y otros β -lactámicos .

Tabla 1. Parámetros cinéticos de las variantes de KPC de *Klebsiella pneumoniae*

β -lactámico	KPC-2			KPC-3			Referencia
	K_m (μM)	K_{cat} (S^{-1})	K_{cat} / K_m ($\mu M^{-1} \cdot S^{-1}$)	K_m (μM)	K_{cat} (S^{-1})	K_{cat} / K_m ($\mu M^{-1} \cdot S^{-1}$)	
Meropenem	12-17	3,8-5,1	0,32	0,47	18,5	0,03	(17,40,41)

2.5.3 Linealización de Lineweaver-Burk

Es una representación gráfica utilizada en cinética enzimática para analizar y visualizar los datos de velocidad de reacción enzimática en función de la concentración del sustrato y con ello, determinar K_m y V_{max} (42). Su representación es una línea recta en un gráfico de $1/V$ vs $1/[S]$, con la pendiente igual a K_m/V_{max} y el intercepto en el eje de las ordenadas igual a $1/V_{max}$ (42).

2.6 Técnicas de evaluación de actividad enzimática

La evaluación de la actividad enzimática es esencial para comprender el funcionamiento de las enzimas y su papel en las reacciones bioquímicas. Existen varias técnicas utilizadas para medir y evaluar la actividad enzimática (43) algunas de las más comunes incluyen: Cromatografía, Fluorimetría, Microscopía de Fluorescencia, Difusión de Luz Dinámica (DLS), Microcalorimetría, Radioactividad, Espectrofotometría y la Electroforesis (44)(45).

2.6.1 Espectrofotometría

Esta técnica permite medir los cambios en la absorbancia de la luz a una longitud de onda específica como resultado de una reacción enzimática (45). Puede usarse para seguir la formación o desaparición de un producto en una reacción enzimática, para estudiar enzimas que catalizan reacciones en donde ocurren cambios en la concentración de compuestos que absorben la luz, como los cromóforos, o para seguir la formación o desaparición de productos o sustratos coloreados (46).

2.6.2 Cromatografía

Es una técnica analítica que se utiliza en la evaluación de la actividad enzimática, especialmente para el análisis y cuantificación de sustratos, productos y otros componentes de las reacciones enzimáticas; dentro de esta técnica se encuentra la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que permite separar óptimamente los sustratos y productos de una reacción enzimática en función de sus propiedades químicas, como tamaño, polaridad o carga (47); además, puede utilizarse para generar datos cinéticos como la velocidad inicial de la reacción, la constante de Michaelis-Menten (K_m) y la velocidad máxima (V_{max}) al medir la concentración de sustrato o producto a lo largo del tiempo (36). Esta técnica se combina comúnmente con detectores específicos, como UV-Vis, de fluorescencia o de masas, para identificar y cuantificar sustratos, productos y otros compuestos relacionados con la actividad enzimática (47).

3 Planteamiento del problema

En el año 2021, la OMS declaró la resistencia antimicrobiana como una de las 10 principales amenazas que afecta la salud pública de la humanidad (48) por factores como el uso irracional y excesivo de los antibióticos, prevención y control deficiente de las infecciones que pueden propagar determinados microorganismos contagiantes, carencia de salubridad y buena calidad en el agua, falta de acceso a los tratamientos y a los conocimientos relacionados con el tema. Todo esto es aún más preocupante al entender que los organismos resistentes a los antimicrobianos están presentes en las personas, los animales, los alimentos, las plantas y en el ambiente (agua, suelo y aire) y que en su gran mayoría dicha resistencia está dada por la capacidad que tienen los microorganismos de alterar su composición genética a medida que se exponen ante ciertos factores externos, haciéndolos más resistentes frente diversos antibióticos y que además sean susceptibles de transferir los genes codificantes hacia otras bacterias al momento de tratar infecciones comunes. Por tal razón, es considerada responsable de aproximadamente del 10 al 15% de las infecciones nosocomiales mundiales, la quinta causa más frecuente en las infecciones en general a nivel mundial, la segunda causa de neumonía nosocomial, la tercera causa de infecciones urinarias, el cuarto de infecciones de sitio quirúrgico y el séptimo responsable de sepsis (49). Sin embargo, a pesar de que la resistencia a carbapenémicos de *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra catalogada en la lista de la OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos como prioridad 1: crítica (48) el estudio de la cinética enzimática de degradación y el diseño y manufactura de nuevos tratamientos presenta cada vez más detrimentos socioeconómicos hacia el cuidado y preservación de la salud en la sociedad. Según cifras recopiladas por la OMS en el año 2019, 32 antibióticos fueron estudiados (50) de los cuales solo 6 se catalogaron como medicamentos innovadores ante el tratamiento de infecciones causadas por diferentes microorganismos patógenos, esta deficiencia en I+D hace que paralelamente aparezcan nuevas superbacterias que se propaguen por todo el mundo. A su vez, otras de las implicaciones socioeconómicas que se encuentran abordando esta problemática, son aquellas asociadas al deterioro y a la limitación en cuanto a la cobertura de los sistemas de salud en diferentes países, debido a que altera la productividad del personal de la salud y requiere de una sobrecarga en las inversiones monetarias destinadas a las instituciones hospitalarias, así como el decaimiento en la calidad de la atención primaria. Es por esto que entender y/o analizar la cinética enzimática de genes de resistencia es de gran importancia, para estimar cómo estas proteínas se adaptan y funcionan dentro de cada microorganismo, y cómo

contribuyen a disminuir su potencial terapéutico y así diseñar nuevas estrategias de contención y erradicación (17)(51).

4 Pregunta de investigación

¿Cómo es la actividad enzimática de la *KPC* en el proceso de hidrólisis del antibiótico β -lactámico meropenem en diferentes aislamientos clínicos Colombianos de *Pseudomonas aeruginosa*?

5 Objetivos

5.1 *Objetivo general*

Evaluar el comportamiento de la actividad enzimática de la carbapenemasa *KPC* en el proceso de hidrólisis de antibióticos carbapenémicos en aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

5.2 *Objetivos específicos*

- 5.2.1 *Determinar las diferencias en la actividad enzimática de la enzima KPC usando extractos de proteínas y bacteria total.*
- 5.2.2 *Establecer las condiciones óptimas de cuantificación del meropenem por medio de HPLC.*
- 5.2.3 *Evaluar las diferencias en la actividad enzimática de aislamientos clínicos de Pseudomonas aeruginosa productoras de carbapenemasa KPC.*

6 Metodología

Tipo de estudio: Se realizó un estudio de tipo experimental, con aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* con el fin de comprender aspectos específicos de esta bacteria en el contexto hospitalario, como su biología, la patogenicidad y la resistencia en infecciones clínicas, siguiendo un diseño experimental que permitió controlar variables y obtener datos cuantitativos. Este proyecto de grado se realizó en la Universidad El Bosque, en el LGMB. Con la siguiente metodología se obtuvieron resultados coherentes para la realización y el logro de cada objetivo planteado.

6.1 Aislamientos bacterianos de estudio

Todos los aislamientos bacterianos y cepas control utilizados en este estudio pertenecen al cepario del LGMB de la Universidad El Bosque, y sus características más importantes son descritas en la Tabla 2.

Tabla 2. Características principales de los aislamientos y cepas que se utilizarán en el estudio.

Aislamiento o cepa	Código	Variante blaKPC	N° de copias	Localización del gen	ST*	Referencia
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	24Pae112	2	2	Cromosoma	235	(24)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	34Pae8	2	1	Plásmido	235	(24,52)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	34Pae23	2	1	Plásmido	235	(52)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	34Pae36	3	1	Cromosoma	111	(53)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	30Pae2	3	1	Plásmido	111	(52)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Pa01 (Control negativo de KPC)	NA	0	NA	437	(24)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24Kpn33 (Control positivo de KPC)	2	1	Plásmido	NA	(24)

*ST: Tipo de secuencia determinado por MLST (Multilocus sequence typing), una técnica que permite establecer la relación genética de dos o más aislamientos bacterianos por medio de la secuenciación de fragmentos de DNA (400 a 500 pb) de 7 genes “housekeeping” específicos.

6.2 *Determinación de las diferencias en la actividad enzimática de la enzima KPC usando extractos de proteínas y bacteria total.*

La enzima *KPC* se localiza principalmente en el espacio periplasmático, que es el espacio que se encuentra entre la membrana interna y la membrana externa en las bacterias Gram negativas (54), en esta ubicación, la enzima tiene acceso a los antibióticos carbapenémicos que pasan a través de la membrana externa y puede inactivarlos, otorgando la resistencia a estos antibióticos; en algunos casos, se ha observado que la *KPC* puede ser secretada al medio externo por las bacterias que la producen (17). Esta secreción podría ser un mecanismo para liberar la enzima y diseminar la resistencia a los carbapenémicos entre otras bacterias en el entorno. Sin embargo, no todas las cepas de *KPC* muestran esta capacidad de secreción, e incluso, se considera un fenómeno adicional que puede contribuir a la propagación de la resistencia a los antibióticos, dado que no es la función principal de la enzima (40).

6.2.1 *Crecimiento bacteriano y extracción de DNA*

Un inóculo de cada aislamiento bacteriano almacenado a -70°C fue sembrado por el método de agotamiento en medio semisólido de agar infusión cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés) (Tabla 3) suplementado con ceftazidima (CAZ) a una concentración final de 32 µg/mL, para garantizar que toda la población bacteriana de trabajo contuviera el gen *blaKPC* (55). Cada aislamiento fue incubado a 37°C por 24 horas. Luego de verificar la pureza de cada aislamiento, una colonia fue resuspendida en 5 mL de caldo BHI suplementado con CAZ (32 µg/mL) e incubada a 37°C y 200 rpm durante 24 horas hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Posteriormente, la resuspensión bacteriana se centrifugó a 10.000 rpm y durante 5 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pellet bacteriano se resuspendió en 150 µL de buffer lisis (TRIS HCL 1M pH 8.0, EDTA 0.5M pH 8.0, sacarosa 7%, lisostafina 1µg/µL y SDS 1.25%), se transfirió a un tubo de 1,5 mL, y se incubó a 37°C por 1 hora. Luego, se adicionaron 300 µL de fenol cloroformo (1:1) y 50 µL de agua DDE; se mezcló en vortex y nuevamente se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo de 1,5 mL y se adicionó 1mL de Etanol frío al 95% para precipitar el DNA, el cual se incubó a -80°C por 45 minutos. Después de este tiempo, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos para eliminar el etanol. El ADN se dejó secar a temperatura ambiente por 1 hora y se resuspendió en 25 µL de agua DDE, la cuantificación y la verificación de la calidad se realizó usando NanoDrop 2000c marca BIORAD®. El ADN se llevó a una concentración de 50 ng/µL, el cual se almacenó a -20°C (56). Se tuvo en cuenta que el ADN debía cumplir unos criterios de calidad como concentración mayor a 15 ng/µL y una pureza con una relación DO (260/280) superior a 1,8 y DO (260/230) ~2,0 (57).

Tabla 3. Composición química en g/L del agar y caldo BHI a pH 7,4 $\pm$ 0,2 a 25°C

Agar BHI		Caldo BHI	
Formulación de BHI (g/L) a pH 7,4 ±0,2 a 25°C			
Infusión de cerebro (sólido)	12,5	Infusión de cerebro (sólido)	12,5
Infusión de corazón de res (sólido)	5,0	Infusión de corazón de res (sólido)	5,0
Peptona proteosa	10,0	Peptona proteosa	10,0
Cloruro de sodio	5,0	Cloruro de sodio	5,0
Fosfato disódico	2,5	Fosfato disódico	2,5
Agar	10,0	Glucosa	2,0

6.2.2 Confirmación molecular de género y especie de los aislamientos

La confirmación molecular de género y especie de los aislamientos *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E.coli* se realizó en PCR múltiple por medio de la amplificación del gen *phnX*, *Khe*, y *uidA* respectivamente para cada cepa bacteriana, empleando los iniciadores GN358 y GN359; GN282 y GN283; GN284 y GN285 (Tabla 4). Para la amplificación se usaron las siguientes condiciones estandarizadas en el LGMB: desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C por 15 segundos, 56°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72°C. El tamaño esperado de los amplímeros era de 165 pb, 243 pb, 388 pb, respectivamente, los cuales fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TBE 0,5X, el recorrido electroforético se realizó a 100 voltios/cm durante 1 hora, teñidos con solución de bromuro de etidio 0,0001% y revelados con un analizador de geles Benchtop 3UV BioDoc-it™ Imaging System con Launch TS Software (Ultra-Violet Products Ltd.).

Tabla 4. Condiciones, iniciadores y productos para cada uno de los aislamientos a amplificar

Bacteria	Iniciadores	Productos	Controles
Klebsiella pneumoniae	GN282 (khe)	243 pb	Negativo: P. mirabilis Positivos: 24Kpn119, E.coli ATCC 25922, 29Pae05
	GN283 (khe)		
Escherichia coli	GN284 (uidA)	388	
	GN285 (uidA)		
Pseudomonas aeruginosa	GN358 (phnX)	165	
	GN359 (phnX)		

6.2.3 Confirmación molecular de la presencia del gen *blaKPC*

La confirmación molecular de la presencia del gen *blaKPC* que codifica a la enzima carbapenemasa tipo *KPC* (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) en los aislamientos de *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli* se realizó en PCR convencional por medio de la amplificación de este mismo gen, empleando los iniciadores GN436 y GN437 (Tabla 5). Para la amplificación se usaron las siguientes condiciones estandarizadas en el LGMB: desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C por 45 segundos, 53°C por 45 segundos, 72°C por 60 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72°C. El tamaño esperado de los amplímeros era de 785 pb, los cuales fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en TBE 0,5X, el recorrido electroforético se realizó a 100 voltios/cm durante 1 hora, teñidos con solución de bromuro de etidio 0,0001% y revelados con un analizador de geles Benchtop 3UV BioDoc-it™ Imaging System con Launch TS Software (Ultra-Violet Products Ltd.).

Tabla 5. Condiciones, iniciadores y productos para el gen KPC

Enzima	Iniciadores	Productos	Controles
KPC	GN436	785 pb	Negativo: <i>E.coli</i> ATCC 25922
	GN437		Positivos: CKPN52

6.2.4 Extracción de proteína con B-PER ®

Partiendo de las placas de cada uno de los aislamientos que inicialmente se habían realizado, se tomó una colonia y se inoculó en 10 mL de caldo BHI suplementado con CAZ (32 µg/mL) (Tabla 3) a 37°C y 250 rpm por 24 horas, hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial; posteriormente, la resuspensión bacteriana se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet bacteriano se resuspendió en 600 µL de *B-PER* ® 89821 (Detergente en tampón Tris 20 mM, pH 7,5, que contiene lisozima y nucleasa universal) (58,59) se mezcló en vortex hasta obtener una solución completamente homogénea y nuevamente se centrifugó a 15000 g durante 5 minutos, para lograr separar las proteínas solubles (citoplasmáticas) de las insolubles (membrana). Finalmente, se realizó la cuantificación y la verificación de la calidad de las proteínas haciendo uso del NanoDrop 2000c marca BIORAD®, una vez terminada la evaluación, se procedió a almacenarlas en -20°C. Se tuvo en cuenta que las proteínas debían cumplir unos criterios de calidad como concentración mayor a 20 mg/mL (60) y una pureza con una relación DO (260/280) inferior a 1,6 y DO (280) mayor a 20 (57).

6.3 Establecimiento de las condiciones óptimas de cuantificación del meropenem por medio de HPLC

Inicialmente se hicieron los ensayos en el espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 10S UV-VIS) del programa de Química Farmacéutica de la Universidad El Bosque, con el fin de corregir y validar las posibles variables que podían interferir en los ensayos con el cromatógrafo SHIMADZU LC-2030.

6.3.1 Curva de calibración con MER TM en espectrofotómetro y M2574-50mg en HPLC

Siguiendo los protocolos que se llevaron a cabo en estudios previos con esta molécula (MER) en el espectrofotómetro(61)(62) se realizaron algunas modificaciones. Se pesaron 0,1160 g de MER TM del laboratorio Vitalis en una balanza analítica OHAUS ® y se llevaron a un balón aforado de 100 mL, donde se aforó con agua DDE, obteniéndose una solución inicial de 1000 µg/mL, de la cual se tomaron 1500 µL y se llevaron a un balón de 10 mL que también se aforó con agua DDE, obteniendo una solución madre de 150 µg/mL; la cual fue empleada en la preparación de cada uno de los puntos de la curva de calibración (Tabla 6). Lo siguiente era determinar la longitud de onda (λ) en donde la molécula tuviera una mayor absorbancia y que a su vez fuera contrastable con lo reportado en la USP (63), para esto se realizó un barrido espectral en donde se obtuvo un rango de 270 nm a 298 nm; dejándose la λ de 280 nm por ser la que presentaba mayor respuesta en el equipo, era congruente con su estructura química y con la USP. Después de haber obtenido resultados reproducibles al evaluar todas las posibles variables que estarían involucradas en el ensayo, se procedió a realizar la curva de calibración en el HPLC; en donde se hizo uso del meropenem trihidratado (M2574-50mg) de SIGMA-ALDRICH con una pureza ≥98% (HPLC) y en una concentración de 10,000 µg/mL para la preparación de cada uno de los puntos (Tabla 7); según lo reportado en literatura (64,65) y con modificaciones; se tuvieron en cuenta las siguientes condiciones cromatográficas: columna ReproSil-Pur Basic-C18, 5 µm, (150 mm x 4,6 mm), temperatura de 25°C, flujo isocrático de 1,0 mL/ min, volumen de inyección de 10 µL, longitud de onda de 280 nm, y una F.M de acetonitrilo, agua y metanol en proporción 15:75:10.

Tabla 6. Componentes de la matriz de cada tratamiento para la lectura en espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 10S UV-VIS).

Tratamiento	Buffer NaH₂PO₄ 20 mM pH: 7,4 (µL)	Antibiótico MER TM (µL)	Agua DDE (µL)	Concentración final (µg/mL)
Blanco	300	-	1200	-
1	300	100	1100	10
2	300	200	1000	20
3	300	300	900	30
4	300	400	800	40

5	300	500	700	50
---	-----	-----	-----	----

Tabla 7. Componentes de la matriz de cada tratamiento para la lectura en HPLC

Tratamiento	Buffer NaH_2PO_4 20 mM pH: 7,4 (μL)	Antibiótico M2574-50mg (μL)	Agua DDE (μL)	Concentración final (μg/mL)
Blanco	200	-	800	-
1	200	1	799	10
2	200	3	797	30
3	200	4	796	40
4	200	5	795	50
5	200	10	790	100

6.3.2 Reacción enzimática con MER™ y M2574-50mg en espectrofotómetro y HPLC con bacteria total y proteína

Bacteria total: Se seleccionaron 5 colonias bien aisladas de igual morfología de cada placa de cultivo y se resuspendieron en 5 mL de Buffer NaH_2PO_4 ¹ 20 mM pH: 7,4. Se ajustó la turbidez del inóculo hasta el tubo 3 de la escala de McFarland, (66) y se midió la OD a una $\lambda=625$ nm en el espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 30 VIS), la cual debía encontrarse en un rango de 0,38-0,42 para garantizar 9×10^8 UFC en la reacción (67), posteriormente, se adicionaron los componentes faltantes de la matriz: MER a una concentración final de 30 μ g/mL, agua DDE y el buffer NaH_2PO_4 20 mM pH: 7,4 (Tabla 8), se incubaron a 37°C por 10 minutos, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos, se filtraron y se midieron las absorbancias en el espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 10S UV-VIS).

¹ La elección del buffer NaH_2PO_4 se hizo a partir de ensayos previos realizados con el buffer *Tris HCl* con el que la molécula MER no mostraba ser estable y presentaba una degradación estructural, incluso sin la presencia de la enzima, por lo que se requirió un medio en el que todos los componentes de reacción no presentaran fluctuaciones, siendo el NaH_2PO_4 el buffer que cumplía con dichos requerimientos.

Tabla 8. Componentes de la matriz de cada tratamiento para los ensayos de reacción enzimática con bacteria total en el espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 10S UV-VIS).

Aislamiento o muestra	Bacteria total (μL)	Buffer NaH₂PO₄ 20 mM pH: 7,4 (μL)	Antibiótico MER[™] 30 μg/mL (μL)	Agua Destilada (μL)
Blanco	-	300	-	1200
24Pae112	5	300	300	895
34Pae8	5	300	300	895
34Pae23	5	300	300	895
34Pae36	5	300	300	895
30Pae2	5	300	300	895
Pa01 (Control negativo de KPC)	5	300	300	895
24Kpn33 (Control positivo de KPC)	5	300	300	895

Proteína: Partiendo de los extractos proteicos realizados previamente, y manteniendo su cadena de frío hasta el momento de medir las absorbancias y áreas, se resuspendieron 2 mg² de cada uno de los aislamientos que se encontraban a una determinada concentración, en un tubo eppendorf de 1,5 mL que contenía los componentes faltantes para la reacción (Tabla 9 y Tabla 10), la cual se llevó a cabo durante 18 a 24 minutos aproximadamente con cada cepa, y con intervalos de lectura de datos cada 3 minutos en el espectrofotómetro y posteriormente en el HPLC; cabe destacar que para el ensayo en el espectrofotómetro, se trabajó con una concentración final de MER[™] 30 μg/mL³ y para el HPLC con M2574-50mg 80⁴ μg/mL; con el fin de poder evaluar su comportamiento en

² La elección de la cantidad de 2mg de extracto proteico se hizo a partir de ensayos previos con 5 mg en donde la lectura de las absorbancias se salía del rango lineal de la curva y con 1 mg en donde las lecturas podrían dificultar el análisis del proceso de hidrólisis, al ser valores <1. Por lo que un punto intermedio (2 mg) sugería mejores resultados.

³ Se seleccionó la concentración de 30 μg/mL del antibiótico MER[™] para la evaluación de hidrólisis puesto que mostró tener una repetibilidad y estabilidad en las réplicas de los ensayos.

⁴ Se seleccionó la concentración de 80 μg/mL del antibiótico M2574-50mg para poder interpolar dentro de la curva de calibración y evaluar desde un punto mayor, cómo se iba dando el proceso de hidrólisis del antibiótico hasta que llegara a una concentración que evidenciara su degradación totalidad.

presencia de la enzima dentro de los puntos ya establecidos en la curva de calibración; a su vez, las condiciones de medición de estos ensayos, fueron las mismas que se usaron en la construcción de dicha curva.

Tabla 9. Componentes de la matriz de cada tratamiento para los ensayos de reacción enzimática con extracto proteico en el espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 10S UV-VIS).

Aislamiento o muestra	Extracto proteico (μL)	Buffer NaH₂PO₄ 20 mM pH: 7,4 (μL)	Antibiótico MER[™] 30 μg/mL (μL)	Agua Destilada (μL)
Blanco	-	300	-	1200
24Pae112	24	300	300	876
34Pae8	26	300	300	874
34Pae23	24	300	300	876
34Pae36	18	300	300	882
30Pae2	20	300	300	880
Pa01 (Control negativo de KPC)	21	300	300	879
24Kpn33 (Control positivo de KPC)	25	300	300	875

Tabla 10. Componentes de la matriz de cada tratamiento para los ensayos de reacción enzimática con extracto proteico en HPLC

Aislamiento o muestra	Extracto proteico (μL)	Buffer NaH₂PO₄ 20 mM pH: 7,4 (μL)	Antibiótico M2574-50mg 80 μg/mL (μL)	Agua Destilada (μL)
Blanco	-	300	-	1200
24Pae112	24	300	12	1164
34Pae8	26	300	12	1162
34Pae23	24	300	12	1164

34Pae36	18	300	12	1170
30Pae2	20	300	12	1168
Pa01 (Control negativo de KPC)	21	300	12	1167
24Kpn33 (Control positivo de KPC)	25	300	12	1163

6.4 Evaluación de las diferencias en la actividad enzimática de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasa KPC.

Teniendo los valores de absorbancia y las áreas bajo la curva de los ensayos de hidrólisis del MER con la enzima KPC, se graficaron los cambios en la concentración que se tuvieron con el pasar del tiempo y a partir de esto, se calcularon las velocidades iniciales de reacción (V_0), la K_m y la V_{max} ; evaluando y analizando las diferencias en la actividad enzimática con las variantes de KPC

Tabla 11. Ecuaciones para calcular la actividad enzimática a partir de los inversos

Velocidad Inicial	Velocidad máxima	Constante de Michaelis-Menten
$V_0 = \frac{\Delta[A]}{\Delta t}$ Donde: - V_0 es la velocidad de la reacción enzimática. - $\Delta[A]$ es la diferencia en la concentración - Δt es la diferencia en el tiempo	$y = mx + b$ $V_{max} = \frac{1}{b}$ Donde: - V_{max} que es la velocidad máxima, representa la velocidad de la reacción cuando la enzima está completamente saturada de sustrato. - b que es el intercepto de la ecuación de la recta	$y = mx + b$ $K_m = V_{max} * m$ Donde: - K_m que representa la concentración de sustrato a la mitad de la velocidad máxima - V_{max} que es la velocidad máxima - m que es la pendiente de la ecuación de la recta

7 Resultados y análisis de resultados

7.1 *Determinación de las diferencias en la actividad enzimática de la enzima KPC usando*

7.1.1 *Crecimiento bacteriano y extracción de DNA*

Se obtuvieron los aislamientos y las cepas control por el método de agotamiento en BHI suplementado con CAZ a una concentración final de 32 µg/mL, para garantizar que toda la población bacteriana de trabajo contuviera el gen *blaKPC*, dado que, a esta concentración, las bacterias en cuestión son resistentes (55). Posterior a esto, se obtuvieron los extractos puros de ADN bacteriano por el método de fenol-cloroformo; que son reactivos orgánicos que pueden separar de manera óptima el ADN de otros componentes celulares, como proteínas y lípidos, resultando en una mayor pureza del ADN extraído, favoreciendo procesos posteriores como la PCR y la electroforesis. Sin embargo, previo a esto se realizó la cuantificación y la verificación de la calidad del ADN, en donde se obtuvo para todas las muestras una concentración mayor a 15 ng/µL, cumpliendo con los criterios de calidad que se estipula en literatura; además, una pureza óptima con una relación DO (260/280) superior a 1,8 (Tabla 12); esta relación se utiliza generalmente para determinar la contaminación por proteínas de una muestra de ácido nucleico, las proteínas aromáticas tienen una fuerte absorbancia UV a 280 nm es por ello que para ARN y ADN puros, las proporciones A260/280 deberían estar alrededor de 2,1 y 1,8, respectivamente (57); una proporción más baja indica que la muestra está contaminada con proteínas y esto podría tener un efecto negativo en las aplicaciones posteriores como PCR, es importante destacar que la proporción de ARN puro es ligeramente superior a la de ADN debido a la presencia de bases de uracilo; por lo tanto, esta relación también puede sugerir qué ácido nucleico predomina en la solución. A su vez, se hace medición de DO (260/230) en donde se obtiene un valor aproximadamente cercano a 2,0 (Tabla 12); indicando una presencia insignificante de contaminantes orgánicos (57) tales como el fenol, uno de los reactivos usados en la extracción de ADN, se considera que las muestras con una relación por debajo de 1,8 tienen una cantidad significativa de estos contaminantes que interferirá con las aplicaciones posteriores como PCR; por otra parte, la lectura de la absorbancia en 260 indica la cantidad de ácidos nucleicos que absorben a esta longitud de onda (57) debido a los restos de bases aromáticas dentro de su estructura, es por ello que las purinas (timina, citosina y uracilo) y las pirimidinas (adenina y

guanina) presentan su absorbancia máxima aquí, lo que las convierte en el estándar para la cuantificación de muestras de ácidos nucleicos.

Tabla 12. Cuantificación y Verificación de la calidad de la extracción de ADN

Aislamiento o control	Concentración ng/μL	A260/A280	A260/A230	A260 (10mm)
24Pae112	1096	1,897	1,866	2198
34Pae8	1093,1	1,808	1,779	21,92
34Pae23	4319,5	1,792	1,998	96,98
34Pae36	2356,4	1,735	1,806	38,59
30Pae2	2595,9	1,866	1,827	51,95
<i>E.coli</i> ATCC 25922 (Control negativo en PCR de KPC)	2240,2	1,766	1,804	44,88
<i>Kpn</i> ATCC BAA 2146 (Control positivo en PCR de KPC)	2032,7	1,845	1,870	128,1
Pa01 (Control negativo de KPC)	791,05	2,128	1,956	15,85
24Kpn33 (Control positivo de KPC)	3895,8	1,902	1,890	78,12

7.1.2 Confirmación molecular de género y especie de los aislamientos

Teniendo en cuenta que para una reacción de PCR se requieren de 10 a 200 ng/ μ L de ADN, dado que concentraciones menores dificultan la estandarización de la misma; el ADN se llevó a una concentración de 50 ng/ μ L y por medio de una corrida electroforética se obtuvieron tres bandas distintas (Figura 2), correspondientes a las especies de *E. coli* (carril 7), *K. pneumoniae* (carril 8 y 15) y *P. aeruginosa* (carril 9,10,11,12,13 y 14), en donde los tamaños esperados eran de 388 pb, 243 pb y 165 pb respectivamente, los cuales se pudieron confirmar mediante la comparación con un marcador de peso molecular 50 pb (carril 1) DNA Ladder (Thermo Scientific) indicando una amplificación exitosa de los fragmentos de cada uno de los genes; que para el caso de *P. aeruginosa* era el gen *phnX* que codifica la 2-fosfono acetaldehído hidrolasa (51), para la *K. pneumoniae* el gen *Khe* que codifica una proteína relacionada con el transporte de hierro (68) y para *E.coli* el gen *uidA* que codifica la enzima β -glucuronidasa (69) (70). Además, se incluyeron muestras de control positivas (carril 4, 5 y 6) para cada una de las bacterias objetivo, que generaron las bandas esperadas y un control negativo (carril 3) que era una especie diferente a

las de interés; finalmente se incluyó una muestra sin ADN para descartar contaminación en los reactivos (carril 2); en todas las muestras y controles se obtuvo un ADN fragmentado íntegro, indicando una calidad óptima en cada una de las extracciones realizadas y que a su vez, son las especies esperadas.

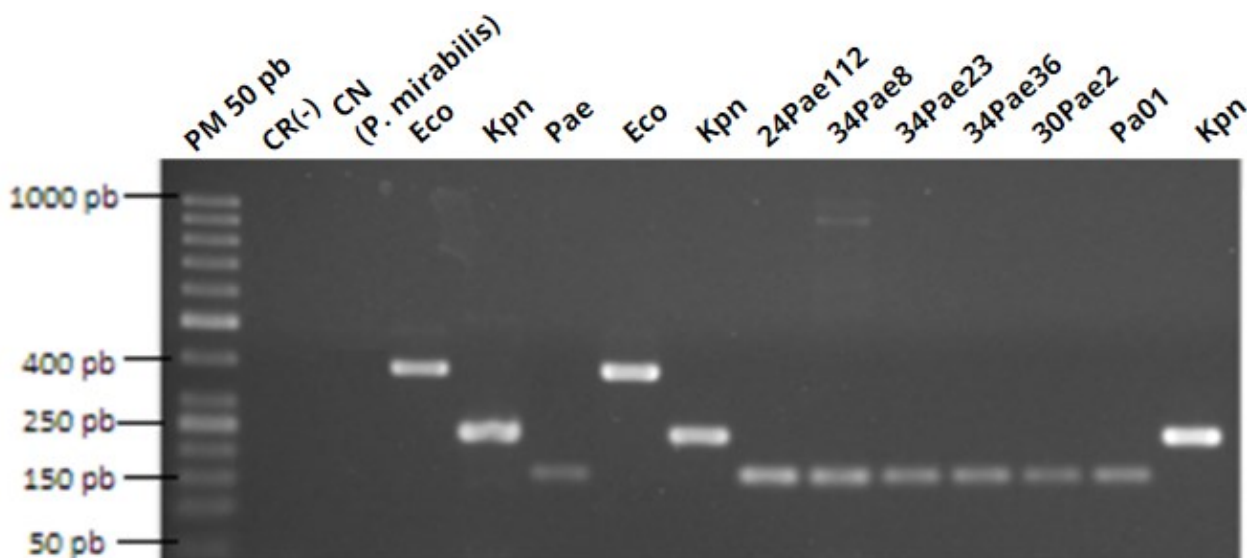


Figura 2. Electroforesis: Gel de agarosa al 1,5% en buffer TBE 0,5X, 100V por 1 hora. Marcador de peso molecular 50 pb DNA Ladder (Thermo Scientific) (1). Control de reactivos (2). Control negativo: *P. mirabilis* (3). Controles positivos: *E. coli* ATCC 25922 (4), 24Kpn119 (5), 29Pae05 (6). Muestras: *E. coli* (7), *Kpn* ATCC BAA 2146 (8) 24Pae112 (9), 34Pae8 (10), 34Pae23 (11), 34Pae36 (12), 30Pae2 (13) Pa01 (14) y 21Kpn34 (15)

7.1.3 Confirmación molecular de la presencia del gen *blaKPC*

Partiendo de una concentración de 50 ng/ μ L de cada uno de los extractos, se hizo la corrida electroforética y se obtuvo una banda específica entre 700 y 800 pb (Figura 3) que corresponde al tamaño esperado de la amplificación del gen *blaKPC*, este resultado se comparó con un marcador de peso molecular 50 pb (carril 1) DNA Ladder (Thermo Scientific) y se confirmó que el tamaño del fragmento era de 785 pb, indicando su presencia en cada uno de los extractos y/o aislamientos clínicos (carril 5,6,7,8,9,10 y 11). Se incluyó una muestra de control positivo que contenía ADN conocido con el gen *blaKPC* (carril 3), la cual generó la banda esperada en este mismo tamaño, una muestra de control negativo (carril 4) que presentaba ausencia de este gen, y una muestra sin ADN para descartar contaminación en los reactivos (carril 2). En todas las muestras y controles se obtuvo un ADN fragmentado íntegro no degradado, indicando una calidad óptima en cada una de las extracciones realizadas y que, a su vez, tienen el gen *blaKPC*, que es el que proporciona la resistencia a los carbapenémicos.

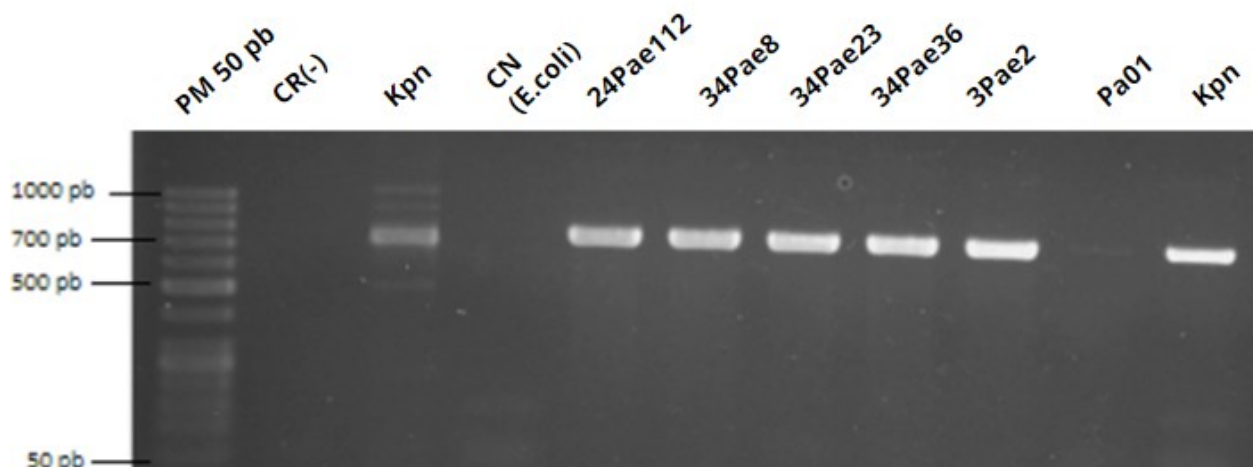


Figura 3. Electroforesis: Gel de agarosa al 1,5% en buffer TBE 0,5X, 100V por 1 hora. Marcador de peso molecular 50 pb DNA Ladder (Thermo Scientific) (1). Control de reactivos (2). Control positivo: Kpn ATCC BAA 2146 (3). Control negativo: E.coli ATCC 25922 (4). Muestras: 24Pae112 (5), 34Pae8 (6), 34Pae23 (7), 34Pae36 (8), 30Pae2 (9) Pa01 (10) y 21Kpn34 (11)

7.1.4 Extracción de proteína con B-PER®

A partir de los aislamientos previamente obtenidos en medio semisólido de agar BHI, se llevó a cabo la extracción de proteínas haciendo uso del método de B-PER; el cual está diseñado para maximizar la recuperación de proteínas, específicamente las que son solubles, este método simplifica el proceso de extracción en comparación con los métodos tradicionales, es efectivo, presenta una buena conservación de la actividad biológica y funcional de las proteínas, y además, incluye una solución de inhibidores de proteasas (PI) que ayuda a reducir la contaminación de ADN y ARN en las muestras (58). Posterior a la extracción se realizó la cuantificación y la verificación de la calidad de las proteínas; en donde se obtuvo para todas las muestras una concentración mayor a 20 ng/μL, cumpliendo con los criterios de calidad que se estipulan en literatura (71), además, una pureza óptima con una relación DO (260/280) inferior a 1,6 (Tabla 13) dado que se requiere una mayor proporción de concentración de proteínas y no de ADN y es en la longitud de onda de 280 nm donde las proteínas y los compuestos fenólicos tienen una mejor absorbancia, gracias a las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina, tirosina e histidina) que se encuentran dentro de estas; es por esto que también se esperaba una absorbancia significativa a esta λ , corroborando que fuera mayor a 20 (57).

Tabla 13. *Cuantificación y Verificación de la calidad de la extracción de proteínas*

<i>Aislamiento o control</i>	<i>Concentración mg/mL</i>	<i>A260/A280</i>	<i>A280 (10 mm)</i>
24Pae112	84,192	1,021	6407
34Pae8	78,003	0,969	56,74
34Pae23	83,957	0,983	61,39
34Pae36	108,74	1,094	72,61
30Pae2	100,01	1,009	67,16
Pa01 (Control negativo de KPC)	95,108	1,059	63,92
24Kpn33 (Control positivo de KPC)	78,806	0,764	52,81

7.2 *Establecer las condiciones óptimas de cuantificación del meropenem por medio de HPLC*

7.2.1 *Curva de calibración con MER™ en espectrofotómetro y M2574-50mg en HPLC*

Si bien es cierto, la guía de la EMA no aborda la validación de la linealidad en la curva de calibración (72); sin embargo, este es un criterio de calidad de gran relevancia desde un punto de vista analítico. Para evaluar la linealidad y la estabilidad del proceso de calibración y la aceptabilidad de dichas curvas, se hicieron repeticiones seriadas con el analito (MER) a diferentes concentraciones, en donde se evaluó la relación lineal entre estas y su señal analítica (área de pico o absorbancia). Para validar la linealidad, se analizó el valor del coeficiente de correlación (R^2) y se utilizó el criterio $R^2 > 0,99$, límite usualmente exigido para la acreditación de ensayos cromatográficos según la norma ISO 17025:2017 (Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de prueba y calibración) (73). El rango lineal se evaluó entre concentraciones de 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL, 50 µg/mL, y 100 µg/mL, estimando la estabilidad de las soluciones por medio de la variación de las señales de respuesta; es importante destacar que en estudios in vitro se ha determinado que la estabilidad del MER es inversamente proporcional a la concentración en la que se encuentre en solución (74) siendo valores > 90 µg/mL en donde se presenta una fluctuación significativa en las señales analíticas (75), esto también se ve influenciado con el aumento del tiempo después de reconstituirlo, y la temperatura $> 30^\circ\text{C}$; por lo que demostró ser estable a temperatura ambiente y a 25°C durante las 8 horas que se empleó

en los ensayos de reacción. Para la curva de calibración en el espectrofotómetro (Figura 4) se usaron estándares con concentraciones conocidas (10µg/mL, 20µg/mL, 30µg/mL, 40µg/mL, 50µg/mL) y sus respectivas lecturas de absorbancia por triplicado (Tabla 14); se ajustó una regresión lineal a los datos y se obtuvo la ecuación de la recta: $y = 0,0147 x + 0,003$, con un coeficiente de correlación de 0,998, indicando una baja existencia de datos atípicos y con una desviación estándar < 1, cumpliendo con el valor de aceptación para este parámetro según la guía de validación de métodos cromatográficos de la FDA (76).

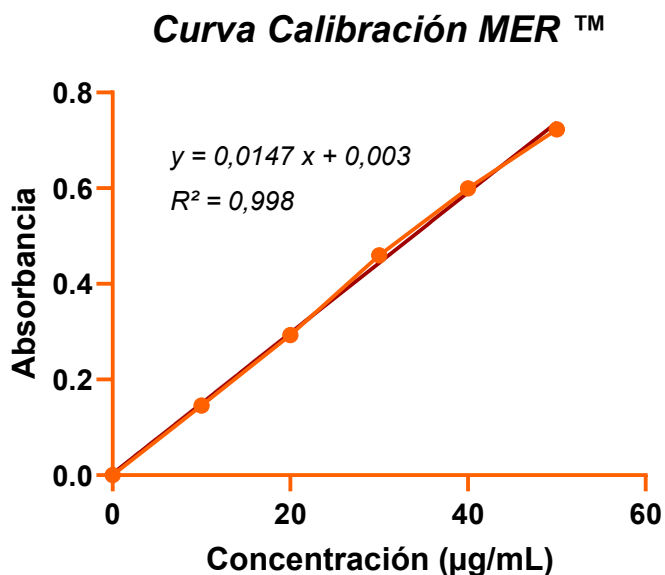


Figura 4. Curva de calibración del MER[™] en el espectrofotómetro λ 280 nm

Tabla 14. Datos del MER[™] en el espectrofotómetro a λ 280 nm

Concentración (µg/mL)	ABS 1	ABS 2	ABS 3	Promedio ABS	Desv. Estándar
10	0,147	0,150	0,142	0,146	0,0040
20	0,294	0,295	0,290	0,293	0,0026
30	0,459	0,460	0,461	0,460	0,0010
40	0,604	0,597	0,600	0,600	0,0035
50	0,712	0,734	0,723	0,723	0,0110

Para el caso de la curva de calibración en el HPLC (Figura 5), inicialmente se estandarizaron las condiciones óptimas de lectura, teniendo en cuenta que el MER es un compuesto ácido e hidrofílico con un pKa de 3,5 (35) requiere una fase móvil polar a pH neutro debido a su baja estabilidad en pH ácidos y básicos, es por ello que se usó acetonitrilo, agua y metanol en proporción 15:75:10 para asegurar la retención y separación del analito en la columna; el flujo de la fase móvil utilizado se basó en el tiempo de análisis de la muestra, seleccionándose 1,0 mL/min con flujo isocrático (77). La resina recomendada para el análisis de MER es C18, la cual está compuesta por una sílica unida a una cadena apolar de 18 carbonos, es una resina versátil, que permite el análisis de compuestos de distinta polaridad. Estas columnas ofrecen una alta resolución, lo que significa que pueden separar componentes muy cercanos en estructura o en tiempo de retención, haciéndola muy efectiva frente a este compuesto; en cuanto al detector, el MER puede generar una absorción de luz en la región UV-VIS debido a ciertas características electrónicas que presenta en su molécula, con un rango de longitud de onda entre 280-300 nm dado que requiere una mayor energía para excitar los electrones que se encuentran en los enlaces π . Sin embargo, cabe resaltar que dichos ensayos se deben llevar a cabo con un analito puro grado HPLC $\geq 98\%$, para garantizar la precisión, la exactitud y la confiabilidad de los resultados analíticos, además de picos bien definidos sin interferentes y separados entre sí. En cuanto a la curva de calibración, se realizó el mismo procedimiento previamente descrito con el espectrofotómetro con concentraciones conocidas (10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 30 μ g/mL, 40 μ g/mL, 50 μ g/mL y 100 μ g/mL) y las señales analíticas (área de pico) por triplicado (Tabla 15), obteniéndose una ecuación de la recta $y = 14978x + 74318$, con un coeficiente de correlación de 0,993, indicando que el 99% de la variación total de los datos, se encuentra dentro del modelo lineal; según autores (78) una mayor pendiente en la ecuación de la recta, refleja una mayor sensibilidad en el equipo; en este caso, para HPLC. Los comportamientos de los datos en los dos equipos evidenciaron que la absorbancia de radiación electromagnética producida por las muestras es directamente proporcional a su concentración (Tabla 14 y Tabla 15), es decir, a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará. Teniendo las curvas de calibración validadas se pueden determinar las concentraciones desconocidas a partir de la ecuación de la recta.

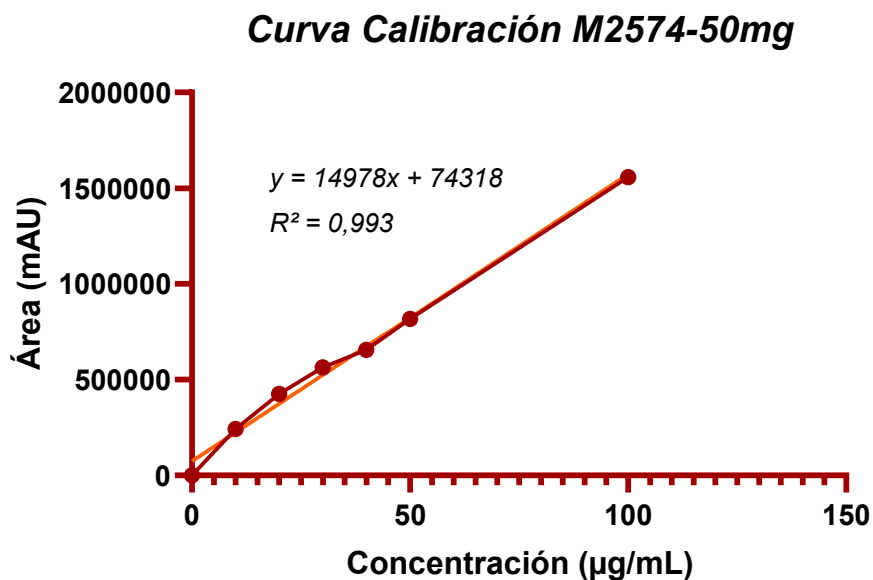


Figura 5. Curva de calibración del M2574-50mg en el HPLC a λ 280 nm

Tabla 15. Datos del M2574-50mg en el HPLC a λ 280 nm

Concentración (µg/mL)	Área 1 (mAU)	Área 2 (mAU)	Área 3 (mAU)	Promedio (mAU)	Desv. Estándar
10	254192	255310	218260	242587,3	0,21075
20	391417	498558	389833	426602,7	0,62320
30	562670	569602	562724	564998,7	0,39866
40	669810	600697	695206	655237,7	0,48910
50	868875	786591	799095	818187,0	0,44340
100	1545933	1541273	1584170	1557125,3	0,23537

Finalmente, se obtuvieron los cromatogramas de las concentraciones empleadas en la curva de calibración, dejándose una muestra de datos en Anexo 1; donde se observan dos picos con t_r diferentes, el primero corresponde a la señal del buffer (NaH_2PO_4) que tiene un t_r aproximadamente de 1,6 minutos y el segundo que pertenece al M2574-50mg con un t_r en un rango de 2,0 a 2,3 minutos, indicando que tiempos menores a estos, serían correspondientes a productos de degradación del sustrato (MER).

7.2.2 Reacción enzimática con MER™ y M2574-50mg en espectrofotómetro y HPLC con bacteria total y proteína

Las metodologías desarrolladas mediante el uso de equipos como espectrofotometría UV/VIS y cromatografía HPLC, permitieron evaluar la capacidad de degradación enzimática y cómo varía su actividad en función de la concentración de sustrato. Inicialmente se hicieron los ensayos con bacteria total por espectrofotometría, en donde se evidenció que después de 10 minutos de reacción a 37°C, con 30 µg/mL de MER™ y 9×10^8 UFC, hubo una reducción gradual del sustrato en orden cero, en un rango del 20-50% con diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre cada uno de los aislamientos, resultando en implicaciones clínicas importantes por la resistencia al sustrato MER™ (79), lo que a su vez limita las opciones de tratamiento. Teniendo en cuenta que las características de cada uno de estos puede influir de manera directa en el comportamiento de la actividad enzimática (80,81), en la Figura 6 se mostró que aquellos que contenían el gen *blaKPC* en su cromosoma *24Pae112* y *34Pae36*, tuvieron una mayor actividad de hidrólisis frente al sustrato, dejando el 54% y 53% respectivamente de antibiótico sin hidrolizar, además de que presentan un valor $P > 0,05$ entre ellas; seguido de aquellos que lo tenían en el plásmido; en donde los aislamientos *30Pae2*, *24Kpn33*, *34Pae8*, *34Pae23*, dejaron el 75%, 76%, 78%, y 77% respectivamente de antibiótico sin hidrolizar; para el caso del control negativo *Pa01* que no presentaba la enzima, dejó un 98%, esta disminución pudo verse favorecida por factores metodológicos o propios del MER™, este aislamiento no presenta diferencias estadísticas significativas frente al MER™. Por su parte, los aislamientos *34Pae8*, *24Kpn33*, *34Pae23* y *30Pae2* tampoco presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellos.

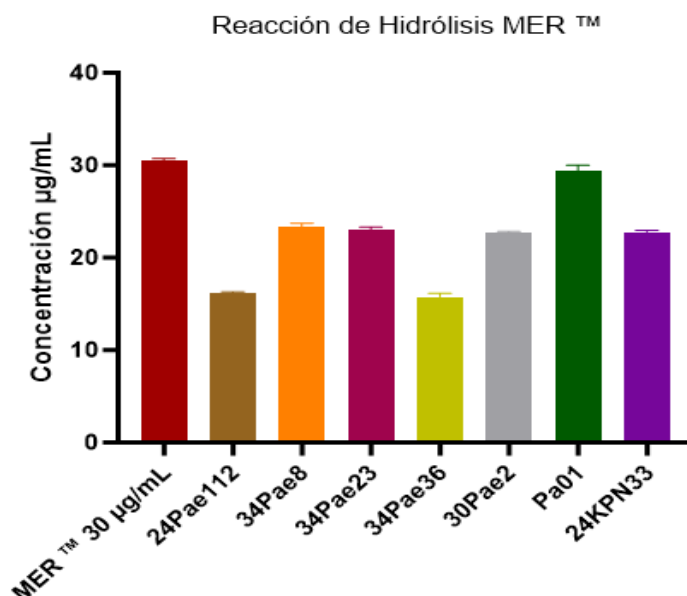


Figura 6. Reacción enzimática con 30 µg/mL MER™ y 9×10^8 UFC de cada uno de los aislamientos clínicos. Las barras verticales sobre las columnas indican la desviación estándar $n=3$; las diferencias estadísticas significativas se hicieron según la prueba Tukey ($P < 0,05$)

En cuanto al ensayo realizado con extracto proteico por espectrofotometría, se evidenció que después de 18 minutos de reacción a temperatura ambiente, con 30 µg/mL de MER™ y 2 mg de proteína, hubo una degradación gradual del sustrato en orden cero, en un rango del 58-92% (Figura 8). Los aislamientos 24Kpn33, 34Pae23, 34Pae36 y 34Pae8 a pesar de que inician la reacción con una concentración más baja de 30 µg/mL MER™ debido a la rápida velocidad de reacción, no presentan diferencias estadísticas significativas entre ellas ($P > 0,05$); aproximadamente después de 18 minutos en reacción quedó el 9%, 42%, 21%, y 18% respectivamente de antibiótico sin hidrolizar; todos estos aislamientos a excepción del 34Pae36 comparten características biológicas similares (Tabla 2), explicando el porqué de su comportamiento frente al sustrato. En cuanto a los aislamientos 24Pae112 y 30Pae2 tuvieron una velocidad de reacción más baja que las anteriores conllevando a ralentizar el proceso de formación del complejo enzima-sustrato y a su vez, enzima + producto; aproximadamente para los 9 minutos de reacción que son los puntos en donde ambas muestras presentan una concentración similar; habían dejado sin hidrolizar el antibiótico en un 33% y 39% respectivamente; sin diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$ entre ellas). En la figura 7 se muestra el comportamiento que tuvo el sustrato desde 0 min a 18 min de reacción enzimática.

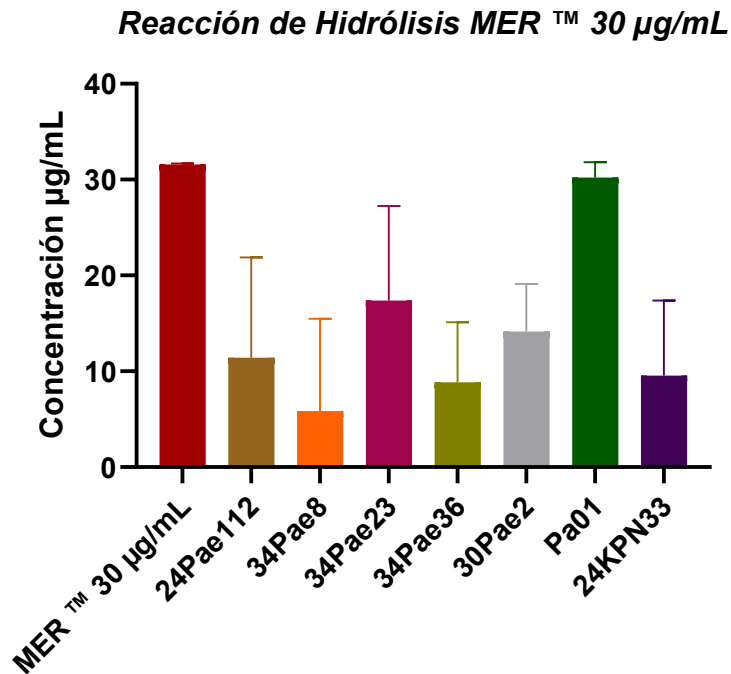


Figura 7. Reacción enzimática con 30 µg/mL MERTM y 2 mg de extracto proteico de cada uno de los aislamientos clínicos.

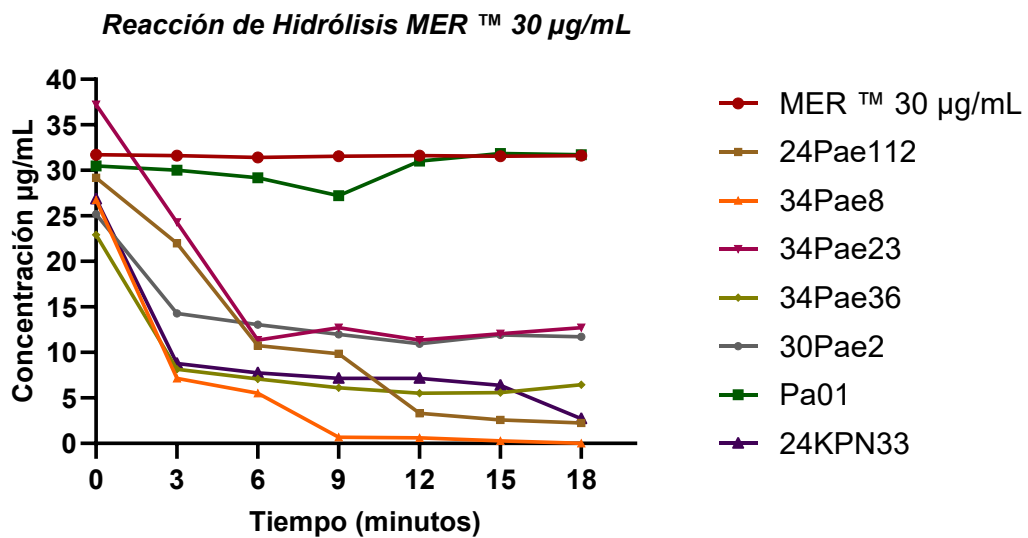


Figura 8. Reacción enzimática con 30 µg/mL MERTM y 2 mg de extracto proteico de cada uno de los aislamientos clínicos. Cada punto es el promedio de tres repeticiones, y las barras de error muestran la desviación estándar $n=3$. Las diferencias estadísticas significativas se hicieron según la prueba Tukey ($P<0,05$)

A su vez, bajo las mismas condiciones previamente estandarizadas, se realizó el ensayo en HPLC con 80 µg/mL de M2574-50mg y 2 mg de proteína, obteniéndose una reducción del 53-93% del sustrato inicial; en la figura 9 se observa una alta desviación en los datos de cada una de las muestras, esto es debido a que se trata de una gráfica en dónde se representa la disminución de la concentración del M2574-50mg desde el tiempo de 0 minutos a 27 minutos de reacción, provocando que los valores entre sí, tengan una mayor dispersión; sin embargo, el comportamiento de hidrólisis del sustrato es conforme a sus características biológicas (Tabla 2).

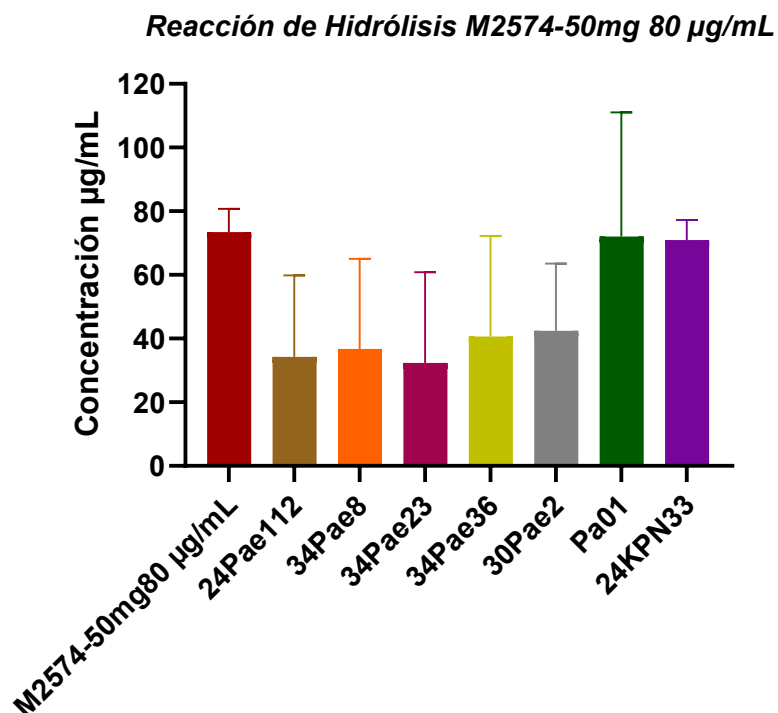


Figura 9. Reacción enzimática con M2574-50mg y 2 mg de extracto proteico de cada uno de los aislamientos clínicos.

Se corrobora que en los dos equipos se presentaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre cada uno de los aislamientos y que empieza a darse una reacción de hidrólisis del sustrato en más del 87,5% a los 15 minutos en la mayoría de los aislamientos; para el caso de HPLC (Figura 10), en un tiempo inicial se observa que la velocidad de reacción es muy rápida, en menos de 1 minuto ya se ha reducido más del 50% del sustrato, sin embargo, de 3-15 minutos la velocidad se estabiliza y empieza a reducir la cantidad del sustrato de forma gradual, comportamiento que se mantiene similar en cada uno de los aislamientos; es importante resaltar que una alta velocidad de reacción de la enzima *KPC* es un indicador de su eficacia en la inactivación de los antibióticos, lo que a su vez puede llevar a una mayor resistencia bacteriana

a estos medicamentos. Los aislamientos *24Pae112*, *34Pae23* y *34Pae8* tuvieron una mayor actividad de hidrólisis frente al sustrato, dejando menos del 1% de antibiótico sin hidrolizar después de 24 minutos de reacción; sin diferencias estadísticas significativas ($P>0,05$ entre ellas); esto también se corrobora con las áreas obtenidas en los cromatogramas (Anexo 2, Anexo 3 y Anexo 4) sin embargo, a pesar de que el aislamiento *24Kpn33* comparte características biológicas con este grupo (Tabla 2), sí presentó diferencias estadísticas significativas ($P<0,05$) al igual que los aislamientos *30Pae2* y *34Pae36*, quienes dejaron un 31% y 25% respectivamente de antibiótico sin hidrolizar después de 27 minutos de reacción (Anexo 5 y Anexo 6); por el contrario, la *24Kpn33* en este mismo tiempo había dejado un 77% de antibiótico sin hidrolizar (Anexo 7), lo cual indica que la variante del gen *blaKPC* podría influir en el proceso de degradación de sustratos como antibióticos β -lactámicos; en cuanto al control negativo *Pa01* que no presentaba la enzima, dejó un 98%, esta disminución pudo verse favorecida por factores metodológicos o propios del *MER*[™], este aislamiento no presenta diferencias estadísticas significativas frente al *MER*[™].

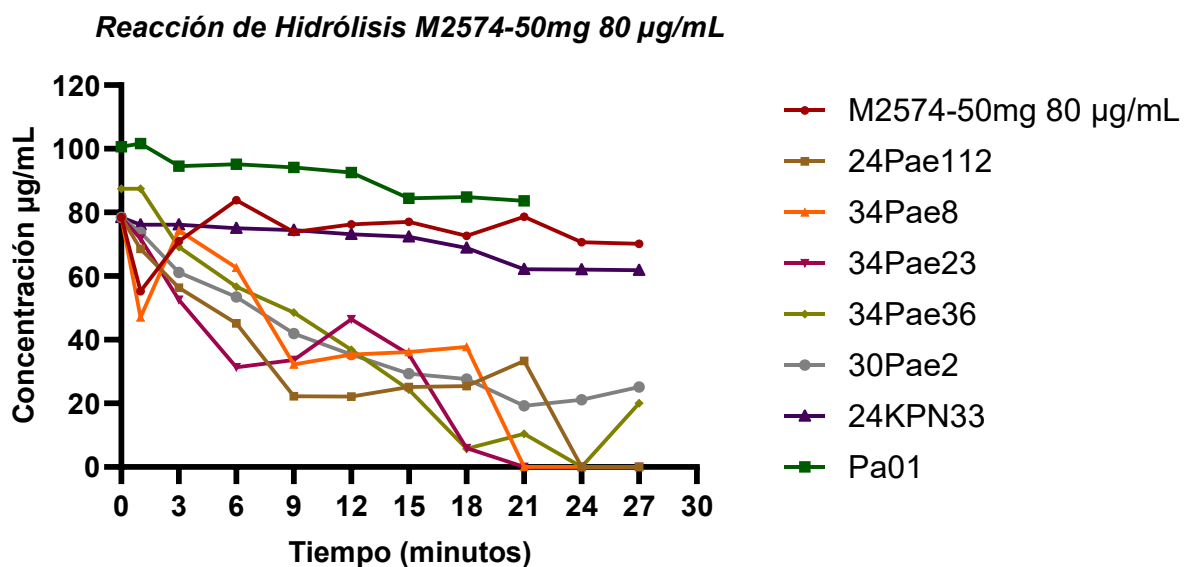


Figura 10. Reacción enzimática con 80 μ g/mL M2574-50mg y 2 mg de extracto proteico de cada uno de los aislamientos clínicos. Las diferencias estadísticas significativas se hicieron según la prueba Tukey ($P<0,05$)

Según lo reportado en literatura (36) se establece que el grado por el que puede interactuar la enzima con el sustrato se basa en la conformación espacial que tienen los péptidos que actúan como ligandos de la molécula sustrato, por lo que se espera que el proceso que se esté llevando a cabo sea no espontáneo y de esta manera, requerir la más mínima cantidad de energía para

poder estabilizar el complejo y así poder obtener el producto de hidrólisis del sustrato a condiciones fisiológicas óptimas de pH, temperatura y tonicidad del medio; esto podría sugerir que las reacciones con el extracto proteico tuvieron un rendimiento superior que con bacteria total, debido a que con la primera, se podía presentar un mayor contacto directo con el sustrato sin impedimento estérico de la membrana de peptidoglicano y otras sustancias que hacen parte de la morfología de las bacterias. Finalmente, en cuanto a la actividad enzimática de *KPC* en los aislamientos clínicos Colombianos de *Pseudomona aeruginosa* en el proceso de hidrólisis del antibiótico β -lactámico MER fue variable, debido a las diferencias en el background genético que presentan cada uno de ellos, sugiriendo que los de variante *KPC 3* en cromosoma fueron los que presentaron una mayor actividad en el proceso de degradación del sustrato, seguido de aquellos *KPC 2* en plásmido y doble copia en cromosoma.

En cuanto a los métodos, se tuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$) en cuanto al porcentaje que quedaba del sustrato sin hidrolizar, lo que podría indicar que la sensibilidad de los equipos fue uno de los factores por los que se presentó una variación en la medición del rendimiento de la reacción y una fluctuación de la lectura de la señal analítica, sobre todo si se contempla las interferencias de los componentes que logran percibir la luz UV/VIS generando atipicidad en los resultados. Mientras que en el equipo HPLC, las cantidades mínimas requeridas para la generación de señales van incluso desde los nanogramos, catalogándose como uno de los métodos más robustos al momento de evaluar el comportamiento cinético de la reacción de las *KPC* detectando pequeñas cantidades y cambios significativos en las concentraciones del sustrato (MER) cuando son transformados.

7.3 Evaluación de las diferencias en la actividad enzimática de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* productoras de carbapenemasa KPC.

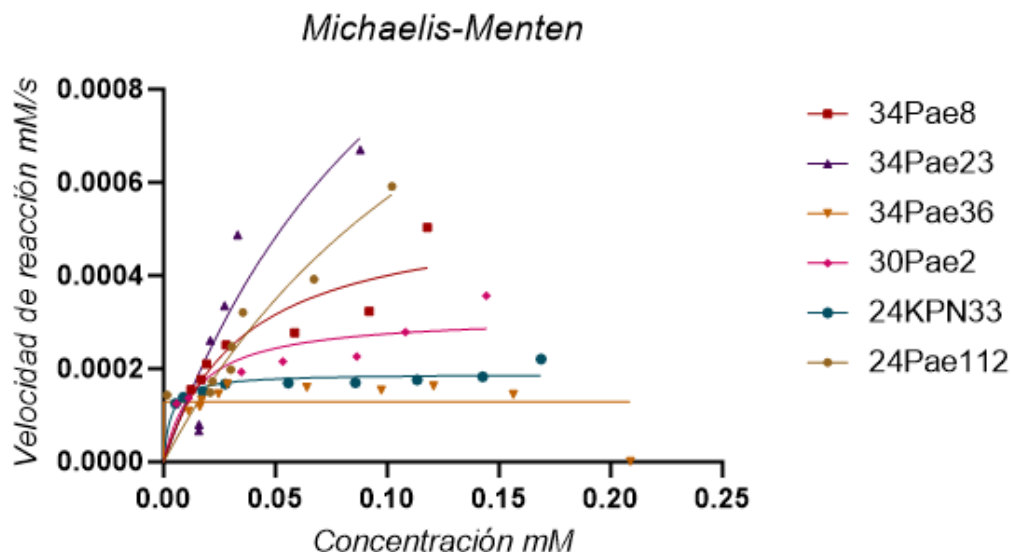


Figura 11. Gráfico de Michaelis-Menten para la enzima KPC presente en cada uno de los aislamientos.

La cinética de Michaelis-Menten es un modelo matemático ampliamente utilizado para describir el comportamiento de las enzimas en reacciones bioquímicas, especialmente en procesos de degradación de sustratos (36). El modelo de Michaelis-Menten se basa en la idea de que una enzima se une a un sustrato para formar un complejo enzima-sustrato, que luego se descompone en productos y la enzima libre se regenera. De modo que, este modelo proporciona una descripción cuantitativa sobre cómo la velocidad de una reacción enzimática depende de la concentración del sustrato y las propiedades cinéticas de la enzima; en este caso, esta cinética es especialmente útil para comprender el proceso de degradación del antibiótico MER. Para ello se graficó la curva de Michaelis-Menten (Figura 11) y se linealizó por medio de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk, y a partir de esta, se pudo determinar los valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) y V_{max} , siendo estos de gran importancia en la cinética enzimática puesto que brinda una medida de la afinidad relativa de una enzima por su sustrato (una enzima con un K_m bajo tiene una alta afinidad por su sustrato, lo que significa que puede unirse eficientemente al sustrato, incluso a bajas concentraciones, y viceversa. El valor de K_m es útil para comparar la eficiencia de diferentes enzimas que catalizan la misma reacción o para evaluar cómo una enzima se comporta en diferentes condiciones; en este caso, se comparan distintas variantes de la enzima carbapenemasa KPC. En cuanto a los resultados obtenidos para K_m en espectrofotómetro, se encuentra que tienen una variación considerable con relación a los valores proporcionados por la literatura (Tabla 1); siendo los aislamientos de 24Pae112 y

24Kpn33 las más cercanas a cumplir dichos valores, teniendo una Km de 10 μM y 14 μM respectivamente, por el contrario, los aislamientos 34Pae8, 34Pae23, 34Pae36 y 30Pae2, presentaron una Km de 6,2 μM , 34 μM , 5,0 μM y 5,9 μM respectivamente; de manera opuesta, los valores obtenidos para Km en el HPLC (Tabla 16), no fueron congruentes a la literatura; estas desviaciones pudieron ser producto de distintas variables durante la fase experimental de este estudio, como por ejemplo las condiciones metodológicas y/o ambientales. Sin embargo, para el caso de los resultados obtenidos en el espectrofotómetro, la comparación entre ellos indica que en promedio los valores de Km para la enzima KPC2, tiene magnitudes mayores a los de KPC3, de modo que la enzima KPC2 tiene menor afinidad por el sustrato indicando que se requieren concentraciones más altas del mismo para saturar la enzima y alcanzar la velocidad máxima (V_{max}) de la reacción. Por el contrario, la KPC3 presenta una baja Km indicando que tiene una alta afinidad por el sustrato, es decir, se satura a concentraciones bajas del mismo y puede unirse eficientemente a él.

Tabla 16. Comparación de las constantes obtenidas de Michaelis-Menten con respecto a lo reportado en literatura.

Aislamiento o cepa	Código	Variante blaKPC	N° de copias	Localización del gen	Km en Literatura (μM)	Km Calculada (μM)	
						ESPECTRO	HPLC
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	24Pae112	2	2	Cromosoma	12-17	10	20
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	34Pae8	2	1	Plásmido		6,2	198
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	34Pae23	2	1	Plásmido		34	21
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24Kpn33	2	1	Plásmido		14	203
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	34Pae36	3	1	Cromosoma	0,47	5,0	23
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	30Pae2	3	1	Plásmido		5,9	197

8 Conclusiones

- La actividad enzimática de *KPC* es variable en cada uno de los aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, debido a las diferencias en el background genético que presentan cada uno de ellos, siendo los de variante *KPC 3* en cromosoma los que presentaron una mayor actividad en el proceso de degradación del sustrato (MER), seguido de aquellos *KPC 2* en plásmido y doble copia en cromosoma.
- La enzima *KPC* en *Pseudomonas aeruginosa* hidroliza el antibiótico β -lactámico MER de forma eficiente con concentraciones y velocidades de reacción variables.
- Las dos metodologías utilizadas (espectrofotometría UV/VIS y cromatografía HPLC), permitieron evaluar la capacidad de degradación enzimática del MER en *Pseudomonas aeruginosa*, la cual fue variable en los diferentes aislamientos clínicos. Esto sugiere que la variante del gen, el número de copias y su localización genómica podrían estar afectando los niveles de hidrólisis del antibiótico.
- Los ensayos en espectrofotómetro, con bacteria total, redujeron el sustrato en un rango del 20%-50% con diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre cada uno de los aislamientos; mientras que con extracto proteico se evidenció una degradación mayor del sustrato en un rango del 58%-92%; de igual modo, en el equipo HPLC se obtuvo una reducción del 53%-93% del sustrato inicial.
- Se midió la afinidad de la enzima *KPC* por el sustrato MER mediante la cuantificación de los valores de K_m (constante de Michaelis-Menten) y V_{max} , partiendo de la concentración del sustrato hidrolizado y la velocidad de reacción.
- El Químico Farmacéutico desempeña un papel esencial en la problemática de la resistencia antimicrobiana. Desde la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos hasta la promoción de un uso responsable de los mismos. Su implicación en la educación, concientización y en la implementación de políticas de uso adecuadas de antibióticos contribuye a preservar la eficacia de estos medicamentos vitales y garantizar que siga siendo una herramienta eficaz en el tratamiento de infecciones.

9 Anexos

<https://docs.google.com/document/d/1OsbweKrgdxJud1xvVOTc0KKyGcLE5ZaAqaXoWXbEX7s/edit?usp=sharing>

10 Recomendaciones

Se recomienda para próximas investigaciones hacer estudios de ensayos de hidrólisis con más antibióticos carbapenémicos (pertenecientes a los β -lactámicos) usados como último recurso frente a la “multirresistencia extrema” de las bacterias y de esta forma, entender cómo están siendo afectados por la enzima *KPC*. A su vez, para mejorar los ensayos de reacción se podría trabajar con extractos más finos nativos de proteína y con ello corroborar que la degradación del sustrato está siendo dada por un extracto puro y con la misma cantidad de proteína; de igual modo, llevar a cabo una comparación entre *KPC* de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* para evaluar qué tan diferente o similar es su comportamiento a pesar de ser especies contrarias entre sí pero que comparten la misma enzima. Respecto a la estabilidad del Meropenem, es importante resaltar que algunos buffers empleados en el proceso de reacción de hidrólisis con carbapenemasas, interfieren y degradan estructuralmente la molécula, incluso sin la presencia de la enzima, por lo tanto, es necesario evaluar su comportamiento con otros buffers diferentes y de esta manera confirmar que la degradación que se está dando en el sustrato es propio de la enzima y no por el buffer que se está empleando; de igual modo, validar las condiciones ambientales y fisicoquímicas de este antibiótico para ensayos in vitro. Finalmente, se recomienda tomar mediciones en intervalos de tiempo más cortos puesto que la degradación del sustrato ocurre de manera muy rápida lo que puede impedir un análisis detallado de la cinética enzimática.

11 Referencias bibliográficas

1. Horacio A. Lopardo. Introducción a la microbiología clínica [Internet]. 1a ed. Horacio A. Lopardo, Lidia M. Gobet, José A. Viegas Caetano, Ana María de los Angeles Moviglia, Laura Vigliarolo, Mariana Suárez, editors. Vol. 1. La Plata; 2016 [cited 2023 Aug 26]. 72–72 p. Available from: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/52389/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
2. Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P. Wide Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing β -Lactamase blaKPC-2 Gene in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2011 Nov [cited 2023 Oct 5];55(11):5350. Available from: [/pmc/articles/PMC3195029/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2195029/)
3. Información sobre EC 3.5.2.6 - beta-lactamasa - BRENDA Enzyme Database [Internet]. [cited 2023 Oct 5]. Available from: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.5.2.6>
4. de Sousa T, Hébraud M, Enes Dapkevicius MLN, Maltez L, Pereira JE, Capita R, et al. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Oct 5];22(23). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34884697/>
5. Horacio A. Lopardo. Introducción a la microbiología clínica [Internet]. 1a ed. Horacio A. Lopardo, Lidia M. Gobet, José A. Viegas Caetano, Ana María de los Angeles Moviglia, Laura Vigliarolo, Mariana Suárez, editors. Vol. 1. La Plata; 2016 [cited 2023 Aug 26]. 72–72 p. Available from: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/52389/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
6. Wang L hong, Feng Y dong, Zhang X wei, Jin L, Zhou F lun, Xu G hong. Elution and Biomechanical Properties of Meropenem-Loaded Bone Cement. *Orthop Surg* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Sep 24];13(8):2417–22. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/os.13139>
7. Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines - Google Libros [Internet]. [cited 2023 Sep 24]. Available from: <https://books.google.com.co/books?id=rrtGKQxcoWIC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
8. Kang CI, Kim J, Park DW, Kim BN, Ha US, Lee SJ, et al. Clinical practice guidelines for the antibiotic treatment of community-acquired urinary tract infections. *Infect Chemother*. 2018 Mar 1;50(1):67–100.
9. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [Internet]. 2010 Dec [cited 2023 Sep 23];74(4):621–41. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mmbr.00027-10>
10. Remold SK, Brown CK, Farris JE, Hundley TC, Perpich JA, Purdy ME. Differential Habitat Use and Niche Partitioning by *Pseudomonas* Species in Human Homes. *Microb Ecol*

- [Internet]. 2011 Apr 19 [cited 2023 Sep 22];62(3):505–17. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-011-9844-5>
11. Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores [Internet]. [cited 2023 Sep 23]. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X02728036>
 12. M. JMV, Q. JNJ. Principales características de la genética bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* que contribuyen con su patogénesis y resistencia. *Hechos Microbiológicos* [Internet]. 2013 Nov 19 [cited 2023 Sep 23];4(2):98–105. Available from: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/21091>
 13. Meropenem - Injection products | FDA [Internet]. [cited 2023 Sep 23]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/development-resources/meropenem-injection-products>
 14. MEROPENEM EN VADEMECUM [Internet]. [cited 2023 Sep 23]. Available from: <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/m020.htm>
 15. El Zowalaty ME, Al Thani AA, Webster TJ, El Zowalaty AE, Schweizer HP, Nasrallah GK, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.1548> [Internet]. 2015 Oct 6 [cited 2023 Sep 22];10(10):1683–706. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.15.48>
 16. Betalactámicos - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales [Internet]. [cited 2023 Sep 24]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-co/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/betalact%C3%A1micos>
 17. Li X, Quan J, Ke H, Wu W, Feng Y, Yu Y, et al. Emergence of a KPC Variant Conferring Resistance to Ceftazidime-Avibactam in a Widespread ST11 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clone in China. *Front Microbiol* [Internet]. 2021 Aug 16 [cited 2023 Sep 27];12:724272. Available from: <https://pmc/articles/PMC8415713/>
 18. Carbapenémicos - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales [Internet]. [cited 2023 Sep 23]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-co/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/carbapen%C3%A9micos>
 19. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2010 Mar [cited 2023 Sep 23];54(3):969–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19995920/>
 20. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1995 [cited 2023 Sep 23];39(6):1211–33. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.39.6.1211>
 21. Yábar MN, Curi-Pesantes B, Torres Pérez-Iglesias CA, Calderón-Anyosa R, Riveros M, Ochoa TJ. Multiresistance and factors associated with the presence of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from urine culture. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2017 Oct 1;34(4):660–5.

22. Walther-Rasmussen J, Høiby N. OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2006 Mar 1 [cited 2023 Sep 23];57(3):373–83. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/jac/dki482>
23. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2007 Jul [cited 2023 Sep 23];20(3):440–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17630334/>
24. Mehta SC, Furey IM, Pemberton OA, Boragine DM, Chen Y, Palzkill T. KPC-2 β -lactamase enables carbapenem antibiotic resistance through fast deacylation of the covalent intermediate. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2023 Oct 5];296. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820001489/fulltext>
25. Xie Z. The Methods and Tools for Mobile Genetic Element Detection and their Application to Systems Medicine. *Systems Medicine: Integrative, Qualitative and Computational Approaches: Volume 1-3*. 2021 Jan 1;1–3:203–7.
26. Transposon | Definition, Types & Function | Britannica [Internet]. [cited 2023 Sep 23]. Available from: <https://www.britannica.com/science/transposon>
27. Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2023 Sep 23];46(3):601–10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2958.2002.03191.x>
28. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2008 Mar [cited 2023 Sep 23];153(Suppl 1):S347. Available from: [/pmc/articles/PMC2268074/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17630334/)
29. Snyder LA, Loman NJ, Faraj LA, Levi K, Weinstock G, Boswell TC, et al. Epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a six-year-long hospital outbreak using high-throughput whole genome sequencing. *Euro Surveill*. 2013;18(42).
30. RESISTENCIA BACTERIANA POR BETA LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO: UN PROBLEMA CRECIENTE [Internet]. [cited 2023 Sep 23]. Available from: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-89582018000200012
31. Martín-Aragón S. Antibióticos de última generación. Revisión. *Offarm* [Internet]. 2011 Dec 1 [cited 2023 Sep 23];30(6):58–63. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-antibioticos-ultima-generacion-revision-X0212047X11622823>
32. Fármacos carbapenémicos - Infecciones - Manual MSD versión para público general [Internet]. [cited 2023 Sep 24]. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-co/hogar/infecciones/antibi%C3%B3ticos/f%C3%A1rmacos-carbapen%C3%A9micos>
33. Anáhuac México U, Georgina Solano-Gálvez S, Manuel Paz Zarza V, Mangwani Mordani S, Martínez Maldonado A, Álvarez Hernández D, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. [cited 2022 Mar 16];180. Available from: www.sochinf.cl
34. Meropenem: Usos, Interacciones, Mecanismo de Acción | Banco de medicamentos en línea [Internet]. [cited 2023 Sep 24]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00760>

35. Perry CM, Ibbotson T. Meropenem. *Drugs*. 2002;62(15):2221–34.
36. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger principios de bioquímica*. 2015 [cited 2023 Sep 24]; Available from: https://books.google.com/books/about/Lehninger_principios_de_bioqu%C3%ADmica.html?hl=es&id=QFaxoQEACAAJ
37. Talens-Perales D, Marín-Navarro J, Polaina J. Enzymes: Functions and Characteristics. *Encyclopedia of Food and Health*. 2016 Jan 1;532–8.
38. Roskoski R. Michaelis-Menten Kinetics. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. 2007 Jan 1;1–10.
39. Terra WR, Ferreira C. Biochemistry of Digestion. *Comprehensive Molecular Insect Science*. 2005 Jan 1;4–6:171–224.
40. Mueller L, Masseron A, Prod'Hom G, Galperine T, Greub G, Poirel L, et al. Phenotypic, Biochemical, and Genetic Analysis of KPC-41, a KPC-3 Variant Conferring Resistance to Ceftazidime-Avibactam and Exhibiting Reduced Carbapenemase Activity. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2019 [cited 2023 Sep 27];63(12). Available from: </pmc/articles/PMC6879233/>
41. Li X, Ke H, Wu W, Tu Y, Zhou H, Yu Y. Molecular Mechanisms Driving the In Vivo Development of KPC-71-Mediated Resistance to Ceftazidime-Avibactam during Treatment of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections. *mSphere* [Internet]. 2021 Dec 22 [cited 2023 Sep 27];6(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34935448/>
42. Libro Lehninger. *Principios de Bioquímica (Bioquímica)*, David L Nelson; Michael M. Cox, ISBN 9788428216678. [Internet]. [cited 2021 Aug 20]. Available from: <https://www.buscalibre.com.co/libro-lehninger-principios-de-bioquimica-bioquimica/9788428216678/p/50901394>
43. Roskoski R. Enzyme Assays. *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2014 Jan 1;
44. Bivehed E, Strömvall R, Bergquist J, Bakalkin G, Andersson M. Region-specific bioconversion of dynorphin neuropeptide detected by in situ histochemistry and MALDI imaging mass spectrometry. *Peptides (NY)*. 2017 Jan 1;87:20–7.
45. Ou Y, Wilson RE, Weber SG. Methods of Measuring Enzyme Activity Ex vivo and In vivo. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* [Internet]. 2018 Jun 6 [cited 2023 Sep 24];11(1):509. Available from: </pmc/articles/PMC6147230/>
46. Libro de Espectroscopía UV Visible [Internet]. [cited 2023 Sep 24]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/306350453_Libro_de_Espectroscopia_UV_Visible
47. (PDF) Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica (O. A. Quattrocchi, S. A. de Andrizzi & R. F. Laba) - DOKUMEN.TIPS [Internet]. [cited 2023 Sep 24]. Available from: <https://dokumen.tips/documents/introduccion-a-la-hplc-aplicacion-y-practica-o-a-quattrocchi-s-a.html?page=4>
48. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. [cited 2023 Sep 21]. Available from:

<https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

49. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [cited 2023 Sep 21]. Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
50. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [cited 2023 Aug 26]. Available from: <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
51. Singh BK, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2023 Sep 26];30(3):428–71. Available from: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x>
52. Ibañez-Dosman JP, Salazar-Ospina JD, Loaiza-Betancurt S, Hernández-Botero JS. Panorama de resistencia antimicrobiana de los aislamientos urinarios de pacientes adultos en los servicios de urgencias de Manizales, Caldas, durante el 2018. *Infectio* [Internet]. 2020 Apr 15 [cited 2023 Sep 26];24(3):149–54. Available from: https://revistainfectio.org/P_OJS/index.php/infectio/article/view/859
53. LaBauve AE, Wargo MJ. Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protoc Microbiol* [Internet]. 2012 May [cited 2023 Sep 26];06(SUPPL.25):Unit. Available from: <http://pmc/articles/PMC4296558/>
54. Espacio periplásmico: qué es, características y funciones [Internet]. [cited 2023 Sep 27]. Available from: <https://www.lifeder.com/espacio-periplasmico/>
55. Conexión EM100 - CLSI M100 ED33:2023 [Internet]. [cited 2023 Sep 26]. Available from: <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED33:2023&scope=user>
56. MoBio Laboratories' UltraClean Microbial DNA isolation kit | Biocompare Product Review [Internet]. [cited 2023 Sep 26]. Available from: <https://www.biocompare.com/Product-Reviews/41081-MoBio-Laboratories-UltraClean-Microbial-DNA-isolation-kit/>
57. Explicación de los resultados de Nanodrop [Internet]. [cited 2023 Sep 27]. Available from: <https://toptipbio.com/the-nanodrop-results-explained/>
58. Reactivo completo de extracción de proteínas bacterianas B-PER™ [Internet]. [cited 2023 Sep 27]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89821>
59. Jiménez-Guerra G, Hoyos-Mallecot Y, Rodríguez-Granger J, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. Método rápido para la detección de la sensibilidad a cefotaxima en enterobacterias. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2023 Sep 27];48(4):320–4. Available from: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412016000400011&lng=es&nrm=iso&tlng=en

60. Cuantificación de proteínas usando absorbancia a 280 nm | Cultivo de células [Internet]. [cited 2023 Sep 27]. Available from: <https://cellculture.altervista.org/quantifying-protein-using-absorbance-at-280-nm/?lang=es>
61. Vista del desarrollo de un método espectrofotométrico UV simple para la determinación de meropenem a granel [Internet]. [cited 2023 Sep 27]. Available from: <https://jpps.juw.edu.pk/index.php/jpps/article/view/10/9>
62. (PDF) REVISTA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOMÉDICAS Desarrollo de un protocolo espectrofotométrico UV para la determinación de la estabilidad de Meropenem durante 8 horas en soluciones para infusión intravenosa a temperatura ambiente y comparación cuantitativa/estabilidad de marcas comercializadas. [Internet]. [cited 2023 Sep 27]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/266879071_JOURNAL_OF_PHARMACEUTICAL_AND_BIOMEDICAL_SCIENCES_Development_of_a_UV-spectrophotometric_protocol_for_the_determination_of_Meropenem_stability_over_8_hors_in_solutions_for_IV_infusion_at_room_tempera
63. Lisa MN, Palacios AR, Aitha M, González MM, Moreno DiM, Crowder MW, et al. A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo- β -lactamases. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2023 Sep 27];8(1). Available from: [/pmc/articles/PMC5599593/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21474395/)
64. (PDF) Development and validation of a RP-HPLC method for the detection of meropenem as a pure compound, in a pharmaceutical dosage form and post thermal induced degradation [Internet]. [cited 2023 Sep 27]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/262049246_Development_and_validation_of_a_RP-HPLC_method_for_the_detection_of_meropenem_as_a_pure_compound_in_a_pharmaceutical_dosage_form_and_post_thermal_induced_degradation
65. Dailly E, Bouquié R, Deslandes G, Jolliet P, Le Floch R. A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2011 May 1 [cited 2023 Sep 27];879(15–16):1137–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21474395/>
66. Hernández A, Yagüe G, Vázquez EG, Simón M, Parrado LM, Canteras M, et al. Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. *Revista Española de Quimioterapia* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2023 Sep 27];31(2):123. Available from: [/pmc/articles/PMC6159385/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21474395/)
67. Lahuerta Zamora L, Pérez-Gracia MT. Using digital photography to implement the McFarland method. *J R Soc Interface* [Internet]. 2012 Aug 7 [cited 2023 Sep 28];9(73):1892–7. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rsif.2011.0809>
68. He Y, Guo X, Xiang S, Li J, Li X, Xiang H, et al. Comparative analyses of phenotypic methods and 16S rRNA, *kdsA*, *rpoB* genes sequencing for identification of clinical isolates

- of *Klebsiella pneumoniae*. Antonie Van Leeuwenhoek [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2023 Sep 26];109(7):1029–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27147066/>
69. Martins MT, Rivera IG, Clark DL, Stewart MH, Wolfe RL, Olson BH. Distribution of uidA gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of beta-glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide media. Appl Environ Microbiol [Internet]. 1993 [cited 2023 Sep 26];59(7):2271. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/182268/>
 70. García López E, Rubio Lozano MS, Alonso Morales RA, Gayosso Vazquez A, Miranda Castro SP, Nicoli Tolosa M, et al. Amplificación múltiple de ADN para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp. en canales de bovino Multiplex DNA amplification to detect *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in bovine carcasses. CyTA – Journal of Food [Internet]. 2009 [cited 2023 Sep 26];7(1):31–6. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/11358120902850651>
 71. Rao L, Gennerich A. Single-Molecule Studies on the Motion and Force Generation of the Kinesin-3 Motor KIF1A. Methods Mol Biol [Internet]. 2022 [cited 2023 Oct 1];2478:585–608. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36063335/>
 72. Good clinical practice | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2023 Oct 1]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/compliance/good-clinical-practice>
 73. ISO/IEC 17025:2017(es), Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración [Internet]. [cited 2023 Oct 1]. Available from: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso-iec:17025:ed-3:v2:es>
 74. Home - MICROMEDEX [Internet]. [cited 2023 Oct 1]. Available from: <https://www.micromedexsolutions.com/micromedex2/librarian/deeplinkaccess?institution=13u6n2i8767p2a542m454p232a0823%5Esecdsdf%5E57089nr>
 75. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences [Internet]. [cited 2023 Oct 1]. Available from: <http://lawarencepress.com/ojs/index.php/JPBMS>
 76. Yuwono M, Indrayanto G. Validation of Chromatographic Methods of Analysis. Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol. 2005 Jan 1;32:243–59.
 77. Wu SS, Chein CY, Wen YH. Analysis of ciprofloxacin by a simple high-performance liquid chromatography method. J Chromatogr Sci [Internet]. 2008 [cited 2023 Oct 2];46(6):490–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18647468/>
 78. Pelaez BSS. QUÍMICA QUÍMICA ANALÍTICA Novena edición Novena edición [Internet]. [cited 2023 Oct 2]. Available from: https://www.academia.edu/41741832/QU%C3%8DMICA_QU%C3%8DMICA_ANAL%C3%8DTICA_Novena_edici%C3%B3n_Novena_edici%C3%B3n
 79. Sacha P, Ostas A, Jaworowska J, Wieczorek P, Ojdana D, Ratajczak J, et al. The KPC type beta-lactamases: new enzymes that confer resistance to carbapenems in Gram-negative bacilli. Folia Histochem Cytobiol [Internet]. 2009 [cited 2023 Oct 5];47(4):537–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20430717/>

80. Galdadas I, Lovera S, Pérez-Hernández G, Barnes MD, Healy J, Afsharikho H, et al. Defining the architecture of KPC-2 Carbapenemase: identifying allosteric networks to fight antibiotics resistance. *Scientific Reports* 2018 8:1 [Internet]. 2018 Aug 27 [cited 2023 Oct 5];8(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-31176-0>
81. Stachyra T, Levasseur P, Péchereau MC, Girard AM, Claudon M, Miossec C, et al. In vitro activity of the β -lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenemase and Enterobacteriaceae expressing KPC carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2023 Oct 5];64(2):326–9. Available from: <https://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp197>