

ANÁLISIS DE LA MOVILIDAD DEL TRANSPOSÓN Tn6454 EN
Klebsiella pneumoniae

Mariana Alejandra Rodríguez torres

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Biología

Bogotá

2022

ANÁLISIS DE LA MOVILIDAD DEL TRANSPOSÓN Tn6454 EN
Klebsiella pneumoniae

Mariana Alejandra Rodríguez torres

Anteproyecto para optar por el título de
Biólogo

Asesor temático

Javier Escobar Pérez

Asesor metodológico

Deisy Abril Riaño

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Biología

Bogotá

2022

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el apoyo incondicional que me han brindado en cada una de mis etapas académicas, y que, gracias a su enorme esfuerzo, son el motivo por el cual hoy puedo culminar mi formación en este nivel académico. Gracias por creer en mí en cada paso que doy y por enseñarme que con dedicación siempre se logran grandes cosas.

Al Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB) de la Universidad El Bosque, por abrirme las puertas para desarrollar este proyecto y compartir conmigo sus enseñanzas y conocimientos. A cada uno de los integrantes del laboratorio les extiendo mi gratitud, gracias por permitirme aprender de ustedes como personas y profesionales, y por la gran compañía durante el desarrollo del proyecto.

Quiero agradecer profundamente a mis directores Javier Escobar Pérez, Deisy Abril Riaño y Zayda Lorena Corredor por orientarme a lo largo de todo este proceso, por su increíble paciencia, compromiso, enseñanza y disposición para resolver cada una de mis dudas. Gracias por ser un ejemplo de constancia y apoyo incondicional, aprendí mucho de ustedes y siempre estaré agradecida por ello. A todos aquellos quienes me ayudaron y me alentaron en cada paso.

CONTENIDO

Tabla de contenido

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN.....	11
1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	15
1.1 Antecedentes del Problema	15
1.2 Planteamiento del Problema	16
2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	20
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo General.....	21
3.2 Objetivos Específicos.....	21
4 JUSTIFICACIÓN.....	22
5 MARCO DE REFERENCIA.....	25
5.1 Generalidades de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
5.2 Antibióticos β -lactámicos.....	26
5.3 Resistencia Carbapenémicos	27
5.4 Elementos Genéticos Móviles	28
5.4.1 Secuencias de Inserción	29
5.4.2 Transposón Tn6454	29
6 DISEÑO METODOLÓGICO.....	31
6.1 Confirmación de la Presencia de Tn6454 en el aislamiento 33Kpn12 de <i>K. pneumoniae</i>	32
6.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria (CIM).....	35
6.3 Evaluación de la movilización del transposón Tn6454 por medio de conjugación..	35

6.3.1	Ensayos de conjugación del plásmido p33Kpn12-1 a J53	36
6.3.1.1	Ensayo de conjugación de <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> J53 en caldo	36
6.3.1.1.1	Ensayo de conjugación de <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> J53 en caldo y siembra masiva del pellet	38
6.3.1.2	Ensayo de conjugación de <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> J53 en caldo mediante pases seriados	39
6.3.2	Ensayo de conjugación de <i>E. coli</i> K12 con R388 transformada con p33Kpn12-KPC y <i>E. coli</i> J53	41
7	RESULTADOS.....	46
7.1	Confirmación de la presencia de Tn6454 en el aislamiento 33Kpn12.....	46
7.2	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).....	48
7.3	Evaluación de la movilización del transposón Tn6454 por medio de conjugación..	51
7.3.1	Ensayos de conjugación del plásmido p33Kpn12-1 a J53	51
7.3.1.1	Ensayo de conjugación de <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> J53 en caldo	51
7.3.1.1.1	Ensayo de conjugación de <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> J53 en caldo y siembra masiva del pellet	53
7.3.1.2	Ensayo de conjugación de <i>K. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> J53 en caldo mediante pases seriados	55
7.3.2	Ensayo de conjugación de <i>E. coli</i> K12 con R388 transformada con p33Kpn12-KPC y <i>E. coli</i> J53	57
8	DISCUSIÓN.....	61
9	CONCLUSIONES	64
10	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	65
	BIBLIOGRAFÍA.....	66
	ANEXOS.....	75

Lista de Figuras

Figura 1. Distribución de microorganismos en UCI adulta en el año 2021 (INSI,2021) ..	18
Figura 2 Datos sobre la resistencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> frente a diversos antibióticos en uso clínico en Colombia durante el año 2012 al 2018. Los antibióticos se representan por diferentes colores. CIP: Ciprofloxacina, CRO: Ceftriazone, CTX: Cefotaxima, GEN: Gentamicina, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, TZP: Tazobactam.....	18
Figura 3 Estructura de los antibióticos β -lactámicos A). Representación esquemática del anillo β -lactámico. B) Representación de un β -lactámico tipo carbapenémico (Lema, & Vanessa, 2022).....	26
Figura 4 Estructura general de Tn6454. Las flechas resaltan las regiones codificantes para transposasas (morado), resolvasas (lila), genes de resistencia (rojo) y genes truncados (verde). Las repeticiones invertidas son pequeñas flechas grises y los sitios de duplicación (TSD) generados por la transposición se ilustraron dentro de un rectángulo negro. Promotores del gen <i>bla_{KPC}</i> se indican mediante líneas naranjas y amarillas, las líneas naranjas indican los promotores P1 Y PX y las líneas amarillas los promotores putativos PP1 y PP2 (Abril et al, 2021).....	30
Figura 5 Fases de la metodología realizada en el proyecto.	32
Figura 6 A. Visualización del plásmido p33Kpn12-KPC, los primer usados para la región A presentan un 100% de identidad (Forero Hurtado, 2021) y Visualización del transposón Tn6454 para la región B. B. I. Se observa Tn6454 en su totalidad con todos los elementos que este conlleva. II. Fragmento de Tn6454 el gen <i>bla_{KPC-2}</i> alineado con los primers 1 y 2 para la amplificación. III. Fragmento de Tn6454 confirmado por la resolvasa, <i>tnpR</i> ; la transposasa, <i>tnpA</i> y el repetido invertido derecho alineado por los primer 3 y 4 para la amplificación (Forero Hurtado, 2021) (Pérez, 2021).	33
Figura 7 Diseño de Ensayo de conjugación simple sembrando una alícuota del producto final. Elaboración propia.	37
Figura 8 Diseño de Ensayo de conjugación simple sembrando la totalidad del producto final. Elaboración propia.	39
Figura 9 Diseño de Ensayo de conjugación por pases seriados sembrando 200 μ l del producto final. Elaboración propia	41

Figura 10 Frecuencias de conjugación de R388. En negro se representan las frecuencias de conjugación para R388 desde <i>E. coli</i> hacia otras bacterias y en gris se representan las frecuencias obtenidas en la conjugación inversa (desde las bacterias hacia <i>E. coli</i>).	42
Figura 11 Diseño de Ensayo de conjugación con plásmido R388. A. Fase de electroporación de la cepa K12, adquisición de los plásmidos p33Kpn12-1 y p33Kpn12-KPC. B. Ensayo de conjugación en medio sólido con filtros, usando como bacteria donadora la cepa K12 Transformada. Elaboración propia.	45
Figura 12 A. Crecimiento de la cepa 33Kpn12 diferentes concentraciones de meropenem. B. Crecimiento de la cepa 33Kpn12 en ceftazidima	47
Figura 13 Amplificaciones de colonias aisladas de la cepa 33Kpn12. A. PCR para identificación de especie <i>K. pneumoniae</i> . B. Amplificación del gen bla _{KPC-2} . C. Amplificación del gen ARNII para identificación del plásmido p33Kpn12-KPC. D. Amplificación de los genes del fragmento II de Tn6454 que constan del gen bla _{KPC-2} y una porción del transposón. E. Amplificación de los genes del fragmento III de Tn6454 que constan de la resolvasa, transposasa, el IRL y el TSD. Convenciones 1M: colonia crecida en medio suplementado con meropenem a una concentración de 1µg/ml 2M: colonia crecida en medio suplementado con meropenem a una concentración de 2 µg/ml 4M: colonia crecida en medio suplementado con meropenem a una concentración de 4µg/ml 1C: colonia crecida en medio suplementado con CAZ proveniente del aislado en meropenem a una concentración de 1µg/ml 2C: colonia crecida en medio suplementado con CAZ proveniente del aislado en meropenem a una concentración de 2µg/ml 4C: colonia crecida en medio suplementado con CAZ proveniente del aislado en meropenem a una concentración de 4µg/ml.	47
Figura 14 CIM de meropenem para las cepas 33Kpn12 de <i>K. pneumoniae</i> y J53 <i>E. coli</i> . Los diferentes colores hacen referencia a los rangos de resistencia determinados por el CLSI. Verde: rango de sensibilidad, Amarillo: rango intermedio y Rojo: rango de resistencia.....	49
Figura 15 CIM de ciprofloxacina para las cepas 33Kpn12 de <i>K. pneumoniae</i> y J53 <i>E. coli</i> . Los diferentes colores hacen referencia a los rangos de resistencia determinados por el CLSI. Verde: rango de sensibilidad, Amarillo: rango intermedio y Rojo: rango de resistencia.....	50

Figura 16 CIM de gentamicina para las cepas 33Kpn12 de <i>K. pneumoniae</i> y J53 <i>E. coli</i> . Los diferentes colores hacen referencia a los rangos de resistencia determinados por el CLSI. Verde: rango de sensibilidad, Amarillo: rango intermedio y Rojo: rango de resistencia.....	51
Figura 17 Resultado del ensayo de conjugación simple, por aislamiento a partir de una alícuota del producto final. A. Posibles aislamientos de transconjugantes en medio suplementado con meropenem y Azida de Sodio. B. Amplificación del gen <i>uidA</i> , para identificación de la especie <i>E.coli</i>	52
Figura 18 Aislamientos de posibles colonias transconjugantes en medio suplementado con meropenem y azida de sodio.	53
Figura 19 PCR de confirmación para las bacterias de interés. A. Amplificación del gen <i>uidA</i> y <i>khe</i> , para identificación de la especie <i>E. coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> . B. Amplificación de gen <i>bla_{KPC-2}</i> para confirmación de este dentro de la cepa de interés.	54
Figura 20 Crecimiento bacteriano en medio con marcador de selección (Meropenem y Azida de Sodio) durante los días 0 al 4.	55
Figura 21 Aislamientos de posibles colonias transconjugantes en medio suplementado con meropenem y azida de sodio Los recuadros decolores hacen referencia a las colonias aisladas de los diferentes días. Verde: día 1, Turquesa: día 2 Morado: día 3 y, Azul: día 4	56
Figura 22 PCR de confirmación para las bacterias de interés. A. Amplificación del gen <i>uidA</i> y <i>khe</i> , para identificación de la especie <i>E.coli</i> y <i>K. pneumoniae</i> . B. Amplificación de gen <i>bla_{KPC-2}</i> para confirmación de este dentro de la cepa de interés.	57
Figura 23. Amplificaciones realizadas a la K12 transformada.	58
Figura 24 Aislamiento de posibles agrupaciones poblacionales resistentes a Trimetoprim-sulfametoxazol, Meropenem y Azida de Sodio	59
Figura 25 A. Amplificaciones de los fragmentos de interés plásmido R388 y p33Kpn12-1, fragmentos de Tn6454 en la agrupación poblacional 11. B. Controles para los fragmentos de interés	60

RESUMEN

Klebsiella pneumoniae es una bacteria Gram negativa de importancia médica, debido a su capacidad de generar diferentes infecciones en el humano dentro o fuera de ambientes hospitalarios. Además, esta bacteria también tiene la capacidad de ser resistente a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos, antibióticos de última línea empleados para el tratamiento de infecciones complejas hospitalarias. Para el 2012 en Colombia se reporta un elevado incremento en aislamientos de *K. pneumoniae* en UCI, generando un 15% de los casos infección, con un incremento del 7% en la resistencia a carbapenémicos. El mecanismo de resistencia a carbapenémicos de *Klebsiella pneumoniae* es la producción de la enzima KPC, la cual es codificada por el gen *bla_{KPC}*. Este gen ha presentado una alta propagación debido principalmente a su movilización por diferentes isoformas del transposón Tn4401, un elemento genético que se ha movilizó en varios plásmidos de esta bacteria. En 2021 el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana identificó al transposón Tn6454, un nuevo elemento no relacionado con el Tn4401 (NTE_{KPC-IIe}), el cual también albergaba el gen *bla_{KPC}*, con un tamaño de 6.648pb, dentro de un plásmido IncN de 15.947pb (p33Kpn12-KPC) en la cepa 33Kpn12 de *K. pneumoniae*. Teniendo en cuenta el impacto clínico que tiene esta nueva plataforma genética, el objetivo de este proyecto fue analizar la movilización del transposón Tn6454 en el aislamiento 33Kpn12 de *Klebsiella pneumoniae*. Para cumplir con este objetivo se plantearon dos estrategias metodológicas diferentes, la primera se basó en el método de conjugación en medio líquido donde la cepa donadora fue la 33Kpn12 de *K. pneumoniae* y la cepa receptora fue *E.coli* J53; la segunda estrategia se basó en el método de conjugación en medio sólido, donde la cepa donadora fue *E.coli* K12 transformada y la receptora fue *E.coli* J53. Finalmente, se obtuvo una población bacteriana resistente a Trimetoprim-

sulfametoxazol, Meropenem y Azida de Sodio, sugiriendo la posible movilización de los plásmidos, que albergan los genes de resistencia a cada uno de estos antibióticos. Para la confirmación de la movilización de Tn6454, se realizaron pruebas moleculares mediante la técnica de PCR convencional, identificando la presencia de Tn6454 dentro de una población bacteriana, en un ambiente genómico diferente al descrito en el plásmido p33Kpn12-KPC, lo que sugiere que el transposón se movilizó de manera independiente.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, Conjugación, Tn6454, Resistencia, *bla*_{KPC}

INTRODUCCIÓN

Desde principios del siglo XXI, las enfermedades infecciosas han sido la causa más importante de muerte en la humanidad (Ventola, 2015), por tal razón la introducción de los antibióticos durante el siglo XX supuso una de las intervenciones más importantes para su control, aumentando la esperanza de vida unos años más en la población, estos han salvado millones de vidas y han revolucionado el mundo de la medicina y la investigación, generando progresos en campos como trasplantes de órganos sólidos y de progenitores hematopoyéticos, la supervivencia de prematuros e inmunodeprimidos etc., donde las infecciones son especialmente prevalentes e importantes (Alós, 2015). Sin embargo, desde hace pocos años, la resistencia bacteriana a los antibióticos se ha presentado como una nueva amenaza contra la eficacia de los fármacos; esta es definida como la capacidad de las bacterias a sobrevivir y crecer en presencia de uno o más antibióticos, para así continuar causando la infección (Barrantes *et al*, 2022).

Aunque en algunas especies poseen mecanismos de resistencia intrínsecos, debido al uso inadecuado de los antibióticos y la exposición de las bacterias a estos, la resistencia se desarrolla rápidamente (Barrantes *et al*, 2022). Este problema aumenta en todo el mundo a niveles peligrosos, cada día aparecen y se propagan nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes (Lirola *et al*, 2022). El gobierno del Reino Unido, realizó una revisión sobre la resistencia a los antimicrobianos, en la que se argumentó que este problema podría aumentar la mortalidad a 10 millones de personas por año para 2050 (Murray *et al*, 2022). La Organización Mundial de la Salud (OMS) y diferentes grupos de investigación están de acuerdo en que la propagación de la resistencia microbiana es un problema urgente. La

tendencia en diferentes partes del mundo y las principales combinaciones de patógenos y fármacos que contribuyen a la carga de resistencia bacteriana son cruciales. Si no se controla, la propagación podría hacer que muchos patógenos bacterianos sean más letales en un futuro (Resistencia a los antibióticos, 2020).

La rápida diseminación de bacterias resistentes amenaza con el incremento de las fallas terapéuticas, entre los principales patógenos resistentes a antibióticos se encuentra *Klebsiella pneumoniae*, un bacilo Gram negativo de gran importancia clínica a nivel mundial. Esta bacteria presenta una gran variedad de mecanismos patógenos la cual la hace un agente causal de infecciones hospitalarias altamente frecuentes (López & Echeverri, 2010), como infecciones en el tracto respiratorio, urinario y bacteriemia (Paterson et al., 2004).

En 2014, la OMS declaró que *K. pneumoniae* era la principal causa de infecciones asociadas a bacterias resistentes a carbapenémicos (antibióticos de última línea) en todo el mundo, debido a que puede ser portadora de genes que codifican a enzimas tipo carbapenemasa que confieren resistencia a estos antibióticos (World Health Organization, 2014). La enzima más frecuente en *K. pneumoniae* para combatir los carbapenémicos, es la enzima KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), este tipo de enzima presenta más de 30 variantes siendo *bla_{KPC-2}* la variante alélica más diseminada en todo el mundo (Wozniak et al., 2021). El primer reporte que se realizó en Colombia de *K. pneumoniae* con *bla_{KPC-2}* fue realizado en un aislamiento clínico de Medellín (Vera et al., 2017) y desde ese momento se ha evidenciado una rápida diseminación del gen *bla_{KPC-2}*, la cual ha surgido por la transferencia horizontal de genes asociados a elementos genéticos móviles como el transposón Tn4401 (Melgarejo et al, 2013), este actúa como el principal mecanismo de

movilización del gen *bla_{KPC-2}*, el transposón se introduce en diferentes partes del genoma ya sea en cromosoma o plásmido, donde posteriormente pueden transponerse a otras bacterias de manera horizontal mediante conjugación, en el cual ocurre un intercambio genético entre diferentes bacterias ocasionando la movilización de genes de resistencia (Alós, 2015); la alta circulación de los plásmidos con el gen *bla_{KPC}*, ha incrementado la aparición de aislamientos resistentes en los ambientes hospitalarios, por lo que el análisis genómico de los elementos genético móviles asociados a este determinante de resistencia se hace relevante para la epidemiología local (Orlek et al., 2017).

En un hospital de Bogotá, Colombia, durante el año 2014 a 2016 se analizaron 143 aislamientos de *K. pneumoniae*, portadores del gen *bla_{KPC-2}* en 69 pacientes hospitalizados, los cuales presentaban en su mayoría más de un aislamiento bacteriano, en los que se estudió la variabilidad genética post endémica intra e interpaciente de los aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de la enzima KPC de una cohorte de pacientes de esta institución. Todos los análisis correspondientes se llevaron a cabo por el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque y el Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Universidad Nacional de Colombia. Durante el proyecto se reportó una paciente que presentaba 14 diferentes aislamientos de *K. pneumoniae*, que se asociaron a tres clones diferentes: ST258, ST504 y ST846 y un aislamiento de *K. variicola* (ST182) que albergaba *bla_{KPC}*. Posteriormente un aislamiento representativo por cada clon fueron secuenciados y analizados, se estudiaron las regiones adyacentes de *bla_{KPC}* y se estableció dos transposones similares de la familia Tn3: Tn4401b y Tn6454 (una nueva estructura genética) involucrados en la adquisición de este gen de resistencia. El nuevo transposón Tn6454 se identificó en los aislamientos 33Kpn9 y 33Kpn12 y 33Kva16.

Se realizó una comparación de la secuencia completa del plásmido p33Kpn12-KPC (ColRNAI) con la base de nucleótidos del NCBI, esta arrojó más de treinta entradas, la mayoría correspondió al plásmido naïve, sin determinantes de resistencia, reportado en *K. pneumoniae*. Siendo más relevante aún, habían dos resultados para dos plásmidos idénticos (pRIVM_C014906_3 y pRIVM_C018535_2) que albergaban el Tn6454 informado en dos aislamientos de *K. pneumoniae* productoras de KPC de Países Bajos. Estos aislados holandeses también albergaban otro plásmido IncFIB(K) (pRIVM_C014906_1 y pRIVM_C018535_1) con una copia de Tn 6454. Adicionalmente la secuencia TN6454 de los plásmidos de *K. pneumoniae* y del plásmido IncN *K. variicola*, se encontró en dos plásmidos IncN adicionales de dos aislados colombianos de *E. coli*: pECAZ159_2 y pEC881_KPC.

La estructura de la nueva plataforma Tn6454 consta de genes TnpA y TnpR codificando una transposasa y una resolvasa, necesarias para la movilización del elemento genético; y albergando como genes pasajeros *bla*_{KPC-2}, y restos de un Δ IS Kpn6 y Δ *bla*_{TEM}, dos repeticiones invertidas a los extremos y dos TSD de 5 pb, a partir de esta secuencia se pudo determinar como un posible mecanismo que está movilizand *bla*_{KPC-2}, con esta secuencia se pudo caracterizar este mecanismo de movilización como un transposón NTE_{KPC-IIe} perteneciente a la familia Tn3 nombrado como Tn6454 el cual es posible que genere la movilización del gen *bla*_{KPC-2} (Abril et al., 2021). Sabiendo lo anterior, el presente proyecto analiza la movilización del transposón Tn6454 en la cepa 33Kpn12 de *Klebsiella pneumoniae* por medio de conjugación “*in vitro*”.

1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Antecedentes del Problema

La resistencia a antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública mundial de carácter urgente, y conforme salen al mercado nuevos antibióticos las bacterias evolucionan rápidamente y son capaces de sobrevivir a su efecto (Barrantes *et al*, 2022), *K. pneumoniae*, es uno de los principales ejemplos de esta problemática, debido a que aislamientos de esta bacteria han adquirido resistencia a los carbapenémicos, los cuales son el último recurso de antibióticos que se emplea para combatir infecciones generadas por la bacteria

Los carbapenémicos son β -lactámicos de amplio espectro con eficacia en infecciones graves causadas por cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Cáceres *et al*, 2021). La resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* se debe a la producción de carbapenemasas, principalmente, a la enzima KPC. El primer reporte de KPC se dio en un hospital de Carolina del Norte en el año 1996, desde entonces los aislamientos de *K. pneumoniae* con KPC se han distribuido por todo el mundo causando gran variedad de infecciones y enfermedades graves. Hasta la fecha se ha reportado una gran variedad del gen *bla*_{KPC-2} en diferentes especies de Enterobacterias, la diseminación de este gen se debe a plásmidos que presentan isoformas del transposón Tn4401 y elementos no relacionados a los Tn4401 (NTE_{KPC} - Non-Tn4401 related element) (Ruiz-Castellanos *et al*, 2022).

El trabajo realizado por Abril y colaboradores en el año 2021 describe la identificación del aislamiento de *K. pneumoniae* (33Kpn12) resistente a carbapenémicos en un hospital de tercer nivel en Bogotá, Colombia. Durante el trabajo se revisaron las historias clínicas de 68 pacientes hospitalizados con aislamientos KPC-Kp en un estudio retrospectivo y

descriptivo entre 2014 y 2016, en el curso del trabajo el aislamiento 33Kpn12 toma gran interés debido a que presenta el gen de resistencia a carbapenémicos (*bla_{KPC-2}*) dentro de un elemento móvil correspondiente a un transposón de la familia Tn3, pero no se identificó ninguna plataforma conocida con la movilización del gen. Dentro de la metodología se emplea una electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y la tipificación multiLocus de secuencias (MLST), dando como resultado el agrupamiento de este aislamiento como una secuencia tipo 504 (ST504) y observándose una transposasa con alta tasa de identidad y cobertura con la transposasa de la familia Tn3 y una resolvasa que juntas se encargan de la movilización, presenta dos genes truncados que son *bla_{TEM}* y *tnpA* de ISKpn6, dos invertidos repetidos en los extremos y dos TSD de 5 pb. A partir de esta secuencia se pudo determinar un posible mecanismo que está movilizand *bla_{KPC-2}*, con la estructura de un transposón de tipo NTE_{KPC-IIe} perteneciente a la familia Tn3 nombrado como Tn6454 el cual es posible que genere la movilización del gen *bla_{KPC-2}* ya que de acuerdo con algunos alineamientos realizados en este estudio, la secuencia del plásmido con el Tn6454 ya se había reportado en diferentes países con un 99% de identidad. Siendo este el primer informe de este clon que moviliza el gen *bla_{KPC-2}*, mediante el nuevo transposón Tn6454.

1.2 Planteamiento del Problema

Klebsiella pneumoniae es un microorganismo Gram negativo, que se encuentra en el medio ambiente, y puede generar diferentes infecciones en el humano, como neumonía, sepsis, infecciones de tejidos blandos y de sitio operatorio. Este microorganismo es la segunda bacteria causante de infecciones en pacientes hospitalizados debido a varias importantes características genéticas que posee, como mecanismos de evasión del sistema inmune, producción de factores de virulencia, y una extraordinaria capacidad para adquirir

DNA foráneo. Esta última característica, le permite adquirir mecanismos de resistencia a los antibióticos, moléculas utilizadas para el tratamiento de sus infecciones, permitiéndole sobrevivir a estos (Ashurst y Dawson, 2018). A través del tiempo, *K. pneumoniae* ha logrado adquirir múltiples genes de resistencia a varias familias de antibióticos, produciendo cepas multirresistentes, las cuales son mucho más difíciles de tratar. Las infecciones intrahospitalarias causadas por *K. pneumoniae* multirresistente incrementan las tasas de mortalidad casi en un 50%, especialmente en pacientes con bacteriemia (Sanctis *et al*, 2018, Montúfar *et al*, 2016).

En Colombia, *K. pneumoniae* es señalada como el cuarto patógeno hospitalario causante de infecciones (Robledo & Robledo, 2000). Entre los años 2009 y 2010, se encontraron 6 hospitales de tercer nivel con presencia de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, demostrando así que esta tiene la mayor prevalencia con 19,1% (Montúfar *et al*, 2016). Para el 2012 los análisis microbiológicos en las UCI mostraron, un elevado incremento en aislamientos de *K. pneumoniae*, generando 15% de los casos infección dentro de las UCI con un incremento del 7% en la resistencia a carbapenémicos. En la *Figura 1* muestra como para el año 2021, *K. pneumoniae* se posiciona en el primer lugar de microorganismos con mayor porcentaje de distribución en servicios UCI (INCI, 2021). Adicionalmente la *Figura 2* muestra la resistencia a carbapenémicos por parte de *K. pneumoniae* durante los años 2012 y 2018. A partir del 2012 se ve un aumento de la resistencia de *Klebsiella pneumoniae* donde se evidencia un aumento de casi el doble para el meropenem y el imipenem y del 5 % para la ciprofloxacina en un periodo de 6 años. En el caso del cefotaxim y el ceftriazone no hay un aumento considerable en la resistencia además de que hay ausencia de datos durante algunos años. En el caso de la gentamicina y el tazobactam

los datos muestran un aumento y posteriormente una disminución que sobrepasa los datos de la resistencia inicial.

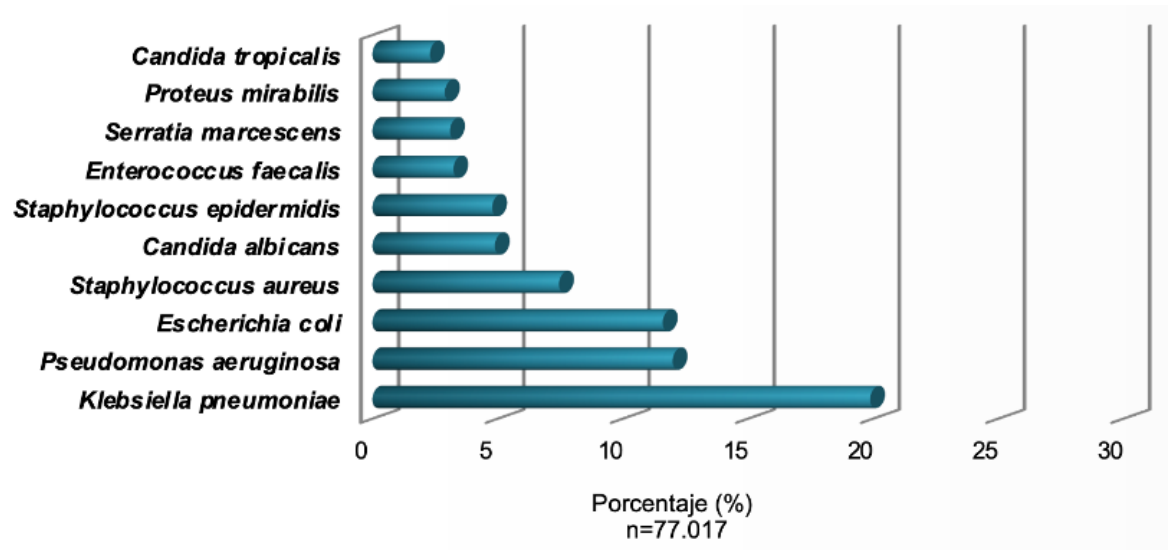


Figura 1. Distribución de microorganismos en UCI adulta en el año 2021 (INSI,2021)

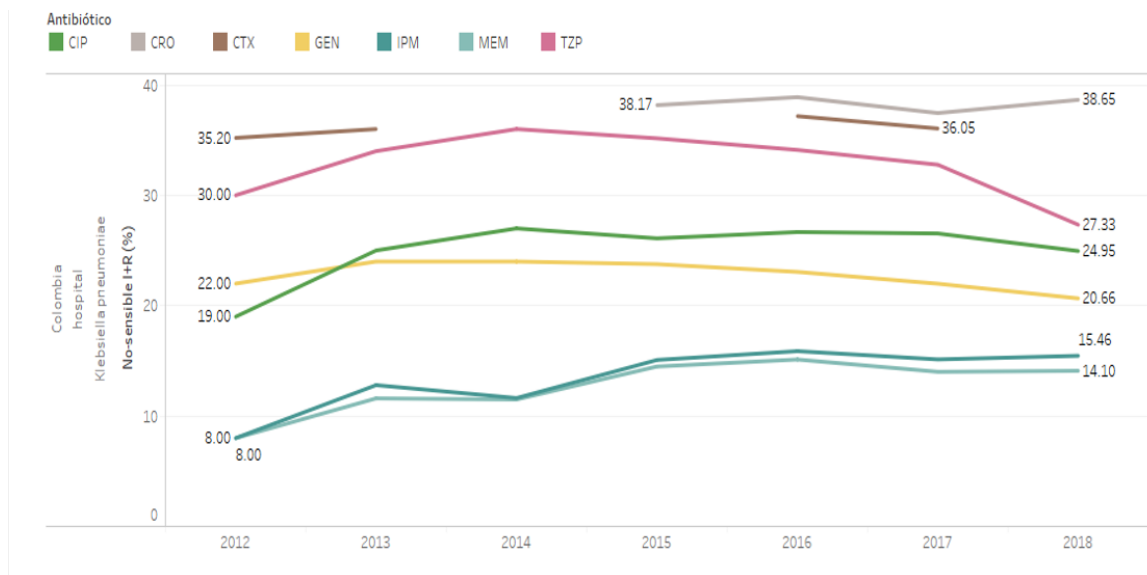


Figura 2 Datos sobre la resistencia de *Klebsiella pneumoniae* frente a diversos antibióticos en uso clínico en Colombia durante el año 2012 al 2018. Los antibióticos se representan por diferentes colores. CIP: Ciprofloxacina, CRO: Ceftriazone, CTX: Cefotaxima, GEN: Gentamicina, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, TZP: Tazobactam.

Se han identificado varios elementos genéticos móviles asociados a la diseminación de los genes de resistencia en *K. pneumoniae*, entre los cuales los más eficientes han sido los transposones y las secuencias de inserción (IS), estructuras capaces de movilizarse de forma autónoma y arrastrar DNA de su entorno. Cada día se descubren y reportan nuevas plataformas genéticas relacionadas con la movilización de genes de resistencia. Por lo que, la adquisición de nuevos genes de resistencia aumenta la dificultad de tratamiento y pone en riesgo el desenlace de los pacientes afectados por este microorganismo. Adicionalmente, en los últimos años el gen bla *bla*_{KPC-2} se ha reportado en elementos genéticos no convencionales (NTE_{KPC}) en *K. pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica* serovar, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae* (Lima et al., 2022), lo que puede tener implicaciones para la capacidad de diseminación horizontal de este gen.

En un estudio realizado en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB) de la Universidad El Bosque se identificó el plásmido p33Kpn12-KPC, el cual contenía el nuevo transposón Tn6454 (reportado por el LGMB en la base de datos del Tn registry disponible en <https://transposon.lstmed.ac.uk/tn-registry>), una nueva isoforma del grupo NTE_{KPC-II} y contiene el gen *bla*_{KPC-2}. Los análisis genómicos comparativos han mostrado que este transposón está circulando en otros aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola* y de *Escherichia coli*; y en otras estructuras plasmídicas (Abril et al, 2021). Estos resultados sugieren que el transposón Tn6454 podría ser activo y capaz de movilizarse de forma independiente, sin embargo, es necesario realizar experimentos controlados (“*in vitro*”) en el laboratorio para tener evidencia experimental sobre su movilización mediada por la actividad de su transposasa o si por el contrario sólo se puede movilizar a través del plásmido p33Kpn12-KPC.

2 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El transposón Tn6454 es capaz de movilizarse de forma independiente o sólo a través del plásmido p33Kpn12-KPC en la cepa 33kpn12 de *Klebsiella pneumoniae*?

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Analizar la movilización del transposón Tn6454 en la cepa 33Kpn12 de *Klebsiella pneumoniae* por medio de conjugación.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los aislamientos 33Kpn12 de *K. pneumoniae* y J53 de *E. coli* a meropenem y ciprofloxacina.
- Evaluar la movilización del transposón Tn6454 por medio de conjugación en *E. coli* y PCR usando primers específicos.

4 JUSTIFICACIÓN

El aumento de microorganismos resistentes a antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública, en el que cada día se realizan proyectos y para la mejora de antibióticos, sin tener en cuenta que las bacterias evolucionan rápidamente para poder sobrevivir a los antibióticos de nuevas generaciones. Entre los antibióticos de última generación se encuentran los β -lactámico de tipo carbapenémico, los cuales se han convertido en el último recurso para combatir infecciones causadas por agentes como lo es *K. pneumoniae* y conforme pasa el tiempo y se hace mal uso de los antibióticos, los microorganismos se vuelven resistentes a los carbapenémicos (Lirola *et al*, 2022). En Estados Unidos, durante el año 2019, el centro para el control y prevención de enfermedades reportó más de 13.100 casos de infección hospitalaria asociada a enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CRE , del inglés “*Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae*”) y 1.100 muertes de pacientes internados por la misma razón (CDC, 2019), conforme suben los números de infecciones por agentes resistentes a carbapenémicos, aumentan las tasas de mortalidad, morbilidad y costos hospitalarios entre un 20% y 50% (Bulman et al., 2021). Puntualmente para una sola infección causada por CRE en EE. UU, el costo de atención puede llegar hasta los 66.031 dólares para los hospitales, y hasta los 8.512 dólares para la sociedad, variando de acuerdo con la gravedad de la infección; lo que sugiere que la rápida diseminación de CRE no solo pone en riesgo la salud pública, sino que amenaza con un incremento en la carga económica (Bartsch et al., 2017).

K. pneumoniae representa entre el 57% y el 74% de la totalidad de infecciones intrahospitalarias en todo el mundo (Bulman et al., 2021). Según la OMS, *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos ha sido catalogada como prioridad crítica, debido a que cada vez son menos los tratamientos que se pueden realizar contra ella debido a sus múltiples rasgos virulentos y sus determinantes genéticos de resistencia. En Colombia en el año 2020, el Instituto Nacional de Salud reporta un aumento en la resistencia a carbapenémicos por parte de *K. pneumoniae* durante el servicio de las Unidades de Cuidados Intensivos, adicionalmente afirman que *K. pneumoniae* es el organismo reportado con más brotes durante el 2020 (Instituto Nacional de Salud, 2021).

El mecanismo por excelencia de resistencia a antibióticos es la producción de carbapenemasas, la cual la enzima KPC es frecuentemente identificada entre los microorganismos (Wozniak et al., 2021). Esta carbapenemasa fue descubierta en 1996, en Carolina del norte en *K. pneumoniae*, es codificada por el gen *bla*_{KPC-2}, tenía una circulación restringida a *K. pneumoniae* y otras enterobacterias; y las variantes de gen *bla*_{KPC-2} más frecuentes son *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3}; la alta propagación del gen *bla*_{KPC} se atribuye a los plásmidos que contienen isoformas del transposón Tn4401, en este caso, a partir de análisis bioinformáticos se presume que Tn6454, se encarga de diseminar el gen *bla*_{KPC-2} (Abril et al. 2021). En Colombia, estudios previos determinaron que la diseminación del gen *bla*_{KPC-2} se debía principalmente por la transferencia horizontal de genes mediada por una gran diversidad de plásmidos de los grupos IncA/C, IncL/M, IncN y ColRNAI que se encontraban asociados a elementos transponibles (Abril et al., 2021; Rada et al., 2020; Sugita et al., 2021).

La rápida transmisión de estos plásmidos ha puesto en riesgo los sistemas de salud pública debido a la facilidad con la que un solo plásmido puede llegar a movilizar múltiples genes de resistencia antibiótica; por lo que resulta interesante entender los procesos que han favorecido la permanencia y estabilidad de estos diferentes grupos de plásmidos en entornos selectivos y no selectivos (Bernabé Balas, 2019; Chen et al., 2017).

En Colombia, los estudios genéticos sobre aislamientos de *K. pneumoniae* con KPC son pocos y adicionalmente se desconoce los mecanismos de movilización del transposón putativo Tn6454 familiarizado con el grupo de transposones tipo Tn3, que a su vez alberga el gen *bla_{KPC-2}* y se encuentra asociada a un contig circular completo correspondiente a un plásmido tipo ColRNAI, y se sugirió, que la adquisición del Tn6454 con el gen *bla_{KPC-2}* era un evento reciente en este grupo de plásmidos (Abril et al., 2021). Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente proyecto se analizó la movilidad del Tn6454 por medio de conjugación “*in vitro*”. Esto motiva a la investigación del transposón mencionado y su actividad de movilización entre plásmidos de *K. pneumoniae*.

5 MARCO DE REFERENCIA

5.1 Generalidades de *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae es un bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, contiene un genoma aproximado de 5.69232 Mb (National Center for Biotechnology Information, 2021). Esta bacteria coloniza superficies mucosas humanas como el tracto orofaríngeo y gastrointestinal, también presenta altos grados de virulencia y resistencia a los antibióticos. Hoy en día *K. pneumoniae* es considerada una bacteria hospitalaria debido a que se ha convertido en la causa más común de neumonía adquirida en hospitales (Ashurst y Dawson, 2018), además la tasa de colonización se incrementa hasta tres veces en el ambiente hospitalario, en forma directamente proporcional a la duración de la estancia y especialmente a la presión selectiva que ejercen los antibióticos sobre la flora comensal. (Echeverri & Cataño, 2010). Una de las últimas líneas de tratamiento para las infecciones graves generadas por *K. pneumoniae* son los antibióticos carbapenémicos, quienes inhiben la síntesis de la pared bacteriana y causan la muerte celular (Suárez & Gudíol, 2009). Sin embargo, es más frecuente encontrar cepas bacterianas resistentes a carbapenémicos, poniendo en riesgo la acción de los antibióticos de última generación y la salud humana (Wozniak et al., 2021).

A pesar de que algunos aislamientos de *K. pneumoniae* presenta una resistencia intrínseca a antibióticos tales como ampicilina, como consecuencia de la producción de la β -lactamasa SHV-1 en el cromosoma bacteriano (Tinoco, 2011); se ha demostrado que la mayor parte de la resistencia antibiótica en esta especie se debe a la adquisición de múltiples genes por transferencia horizontal de genes mediante plásmidos y otros elementos genéticos móviles (Cubero González, 2015). La resistencia adquirida mediada por la

producción de carbapenemasas hidrolizantes de carbapenémicos es actualmente una de las resistencias más comunes y frecuentes en aislados de *K. pneumoniae* en todo el mundo (Villegas et al., 2006).

5.2 Antibióticos β -lactámicos

Los β -lactámicos son antibióticos de actividad bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática alcanzada, siempre que esta exceda la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente causal (Calles, *et al* 2022). La característica principal de este grupo es la presencia de un anillo betalactámico (*Figura 1*); una estructura compuesta por 3 carbonos, un nitrógeno y un grupo carbonilo unido al carbono β (Vera-Leiva *et al.*,2017). Estos antibióticos producen su efecto principalmente a través de la inhibición de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana, interfiriendo en las reacciones de transpeptidación de la síntesis de la pared celular bacteriana (Lema, & Vanessa, 2022).

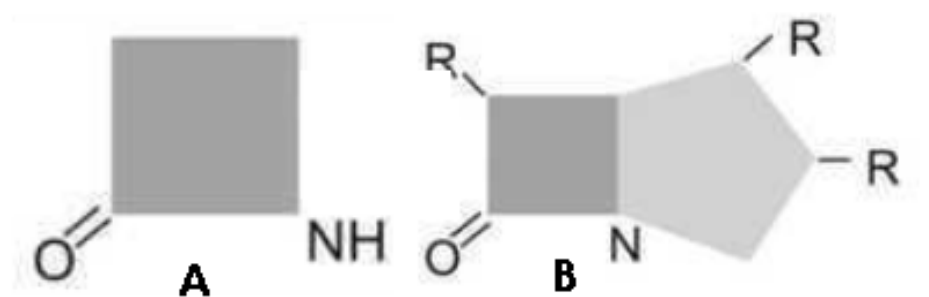


Figura 3 Estructura de los antibióticos β -lactámicos A). Representación esquemática del anillo β -lactámico. B) Representación de un β -lactámico tipo carbapenémico (Lema, & Vanessa, 2022).

La pared celular, es la capa externa que mantiene la integridad celular y previene la lisis celular de la presión osmótica alta. Esta pared está compuesta por un polímero con enlace cruzado de polisacárido y péptidos conocido como peptidoglucano, este contiene aminoazúcares alternantes, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico. Un péptido de cinco aminoácidos que termina D-alanil-D-alanina, está relacionado con el azúcar ácido N-acetilmurámico. La proteína de unión a penicilina (PBP) elimina la alanina terminal en el proceso de formar un enlace cruzado con un péptido cercano, removiendo así la propiedad de rigidez de la pared celular. Los antibióticos β -lactámicos, análogos estructurales del sustrato de D-Ala-D-Ala natural, se unen covalentemente al sitio activo de las PBP. Esta unión inhibe la reacción de transpeptidación y detiene la síntesis de peptidoglicano, y la célula muere (Lema, & Vanessa, 2022).

Los antibióticos carbapenémicos son un grupo de β -lactámicos con amplio espectro de actividad bactericida que han demostrado tener un grado alto de resistencia a las β -lactamasas. Este grupo de antibióticos es considerado como las últimas líneas de defensa contra infecciones bacterianas.

5.3 Resistencia Carbapenémicos

La resistencia antibiótica es la capacidad de un organismo de sobrevivir a el mecanismo de acción de un antibiótico. La resistencia se puede producir por selección natural a través de mutaciones producidas por azar, o por mecanismos de transferencia horizontal de genes (Moreno M et al., 2009). Los mecanismos de resistencia más estudiados son los cambios de proteínas de la membrana externa, bombas de flujo específicas, producción de enzimas tipo β -lactamasas y modificaciones del sitio blanco.

Las bacterias como *K. pneumoniae* expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que pierda su funcionalidad. En este caso, la producción de enzimas tipo β -lactamasas es el principal mecanismo de resistencia empleado. Estas hidrolizan los antibióticos β -lactámicos y evitan que el antibiótico se pueda unir a las PBP (Monge,2013).

En el año 2010 se postula una clasificación funcional actualizada, basada en características específicas de cada enzima. En el caso de los carbapenémicos las dos β -lactamasas que con mayor frecuencia se asocian a resistencia son las carbapenemasas. Las carbapenemasas tienen la capacidad de hidrolizar los carbapenémicos. Además, presentan la característica de ser resistentes contra la acción de los inhibidores de β -lactamasas disponibles (Monge,2013). Su actividad hidrolítica depende del sustrato sobre el que actúan, por ejemplo, SME-3 y KPC-2 hidrolizan mejor el Imipenem que el Doripenem (Monge,2013).

Muchos genes que codifican para enzimas β -lactamasas se localizan en el cromosoma, pero existen reportes de aislamientos de *K. pneumoniae* que presentan los genes que codifican para estas enzimas en los plásmidos, en el caso de la enzima KPC de *K. pneumoniae*, los genes *bla*_{KPC-2}, están flanqueados por transposones ubicados dentro de los plásmidos (Monge,2013).

5.4 Elementos Genéticos Móviles

Los elementos genéticos móviles (EGM) son fragmentos de ADN capaz de trasladarse de una parte del genoma a otra. Estos elementos contribuyen a la transferencia horizontal de genes entre bacterias, junto con algunos otros mecanismos como los fagos y los elementos

integradores. Entre los elementos genéticos móviles destacan dos tipos; las secuencias de inserción y los transposones (Bennett, 2004).

En algunos EGM, está presente el gen (*tnpA*), el cual presenta un papel fundamental, puesto que codifica una proteína llamada transposasa, una enzima encargada de mediar la transposición. El proceso de transposición es netamente dependiente de la transposasa, puesto que esta se encarga de identificar los repetidos invertidos del transposón ubicados en cada extremo de la secuencia, unirse a estos y catalizar el proceso transportándose a una nueva región de destino (Partridge et al., 2018).

5.4.1 Secuencias de Inserción

Las secuencias de inserción son el EGM más simple, se encuentran constituidas por un gen que codifica para una transposasa, y las llamadas IRs o secuencias repetidas invertidos, que como su nombre lo indica se trata de secuencias cortas que se repiten al comienzo y al final de cada secuencia de inserción, esta región es la que la transposasa reconoce. En algunos casos estas secuencias pueden poseer genes que codifican para resolvasas, enzimas encargadas del reordenamiento del ADN cuando se integra en la región de destino.

Lo que diferencia a una IS del resto de EGM, es que este elemento codifica solo la función necesaria para la transposición. La simplicidad en funcionalidad de las secuencias de inserción hace que por lo general son secuencias cortas, que normalmente se encuentran entre el rango de 1.5 Kb a 2 Kb (Bennett, 2004).

5.4.2 Transposón Tn6454

Los transposones (Tn) son EGM más complejos, y se definen como un elemento transponible que además de codificar para una transposasa, tiene genes asociados diferentes a los de la función de transposición. Normalmente, los genes asociados confieren a la

bacteria una ventaja, ya sean genes que le faciliten desarrollar un mecanismo de patogenicidad o de resistencia bacteriana, estos últimos son los más estudiados puesto que tienen una importancia clínica, esta región recibe el nombre de gen estructural. En el caso de este estudio, el gen estructural es blaKPC, una secuencia de ADN que codifica para la enzima KPC.

El transposón Tn6454 (Figura 2), tiene un tamaño de 6.648 pb, está insertado dentro del plásmido p33Kpn12-KPC, compuesto por dos genes codificantes de transposa y resolvasa (tnpA y tnpR), lo que permite la movilización del elemento genético; corresponde a una nueva isoforma (e) de los elementos NTE_{KPC-II}, ya que alberga un gen Δ bla_{TEM} y un gen bla_{KPC-2}. Se encuentra entre un nuevo subgrupo de NTE_{KPC-II}, ya que no tienen ninguna relación con ninguno de los subgrupos informados anteriormente (a–d), por tal razón se le otorga un nuevo subgrupo a este transposón NTE_{KPC-IIe} (Abril et al, 2021).

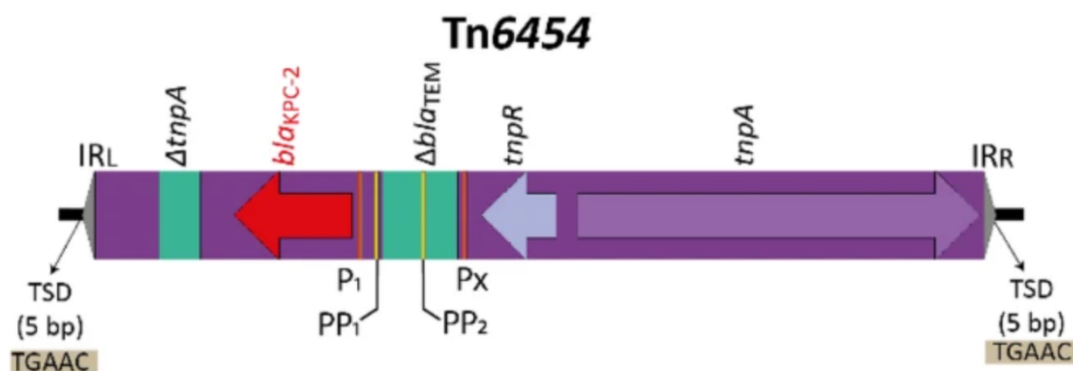


Figura 4 Estructura general de Tn6454. Las flechas resaltan las regiones codificantes para transposasas (morado), resolvasas (lila), genes de resistencia (rojo) y genes truncados (verde). Las repeticiones invertidas son pequeñas flechas grises y los sitios de duplicación (TSD) generados por la transposición se ilustraron dentro de un rectángulo negro. Promotores del gen bla_{KPC} se indican mediante líneas naranjas y amarillas, las líneas naranjas indican los promotores P1 Y PX y las líneas amarillas los promotores putativos PP1 y PP2 (Abril et al, 2021).

6 DISEÑO METODOLÓGICO

Teniendo en cuenta que el aislamiento de *K. pneumoniae* 33Kpn12 tiene dos plásmidos, p33Kpn12-1 y p33Kpn12-KPC. El primero es un plásmido de 116.956 pb que es conjugativo y contiene genes que otorgan resistencia a cefalosporinas de tercera generación, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol y algunos aminoglucósidos (como amikacina), el segundo es un plásmido de 15.947 pb que no es conjugativo pero si movilizable, lo que quiere decir que pueden ser transferidos a cepas receptoras con otro plásmido conjugativo capaz de moverse, este contiene a Tn6454 con el gen *bla_{KPC}*, confiriéndole resistencia a carbapenémicos. Por lo que en caso de que el gen *bla_{KPC}* pueda moverse hacia otros aislamientos, esta movilización se realizaría mediante dos rutas, por la movilización independiente de Tn6454 hacia el plásmido conjugativo como lo es p33Kpn12-1 y este se conjuga en otra cepa o por movilización del plásmido p33Kpn12-KPC a partir del plásmido p33Kpn12-1.

La *Figura 5* muestra el diagrama de flujo metodológico, desarrollado en el proyecto. Para determinar cuál de estos mecanismos podría estar involucrado en la movilización de este importante gen de resistencia, se llevaron a cabo ensayos de conjugación usando la cepa de *E. coli* J53 resistente a azida de sodio como bacteria receptora y diferentes marcadores de selección, exclusivos para el plásmido p33Kpn12-1 y para el p33Kpn12-KPC. Adicionalmente se utilizó el plásmido R388, un plásmido conjugativo muy usado en ensayos de movilización (Campo, 2016).

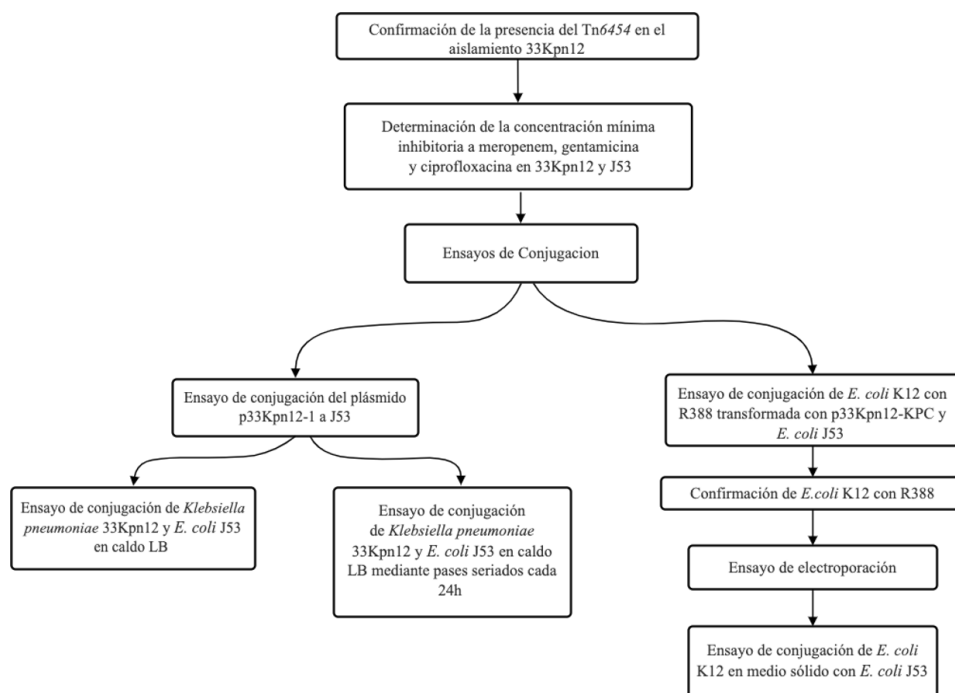


Figura 5 Fases de la metodología realizada en el proyecto.

6.1 Confirmación de la Presencia de Tn6454 en el aislamiento 33Kpn12 de *K. pneumoniae*

Se realizó la confirmación de resistencia a meropenem y de la presencia del Tn6454 en el aislamiento 33Kpn12 recuperado del cepario usando primers específicos (Tabla 1). Para esto, la cepa 33Kpn12 fue resuspendida en agar LB (Luria Bertani), teniendo en cuenta que KPC confiere resistencia a los antibióticos β -lactámicos incluidas las cefalosporinas (Velásquez et al., 2013), el agar fue suplementado con ceftazidima (16 $\mu\text{g/ml}$), con incubación a 37°C durante 24 horas. Luego, se tomó una colonia aislada, se inoculó en 5ml de caldo LB con ceftazidima (16 $\mu\text{g/ml}$) y fue incubada a 37°C con agitación constante a 200 rpm. A partir de este crecimiento se realizó extracción de ADN plasmídico por ebullición. Finalmente se realizaron pruebas moleculares mediante la técnica de PCR convencional para confirmar la especie *K. pneumoniae*, a través de la amplificación de un

fragmento del gen *khe*, de *bla*_{KPC} y del plásmido p33Kpn12-KPC por la amplificación del gen ARNII y de los fragmentos I y II de Tn6454 (Figura 6 y Tabla 1).

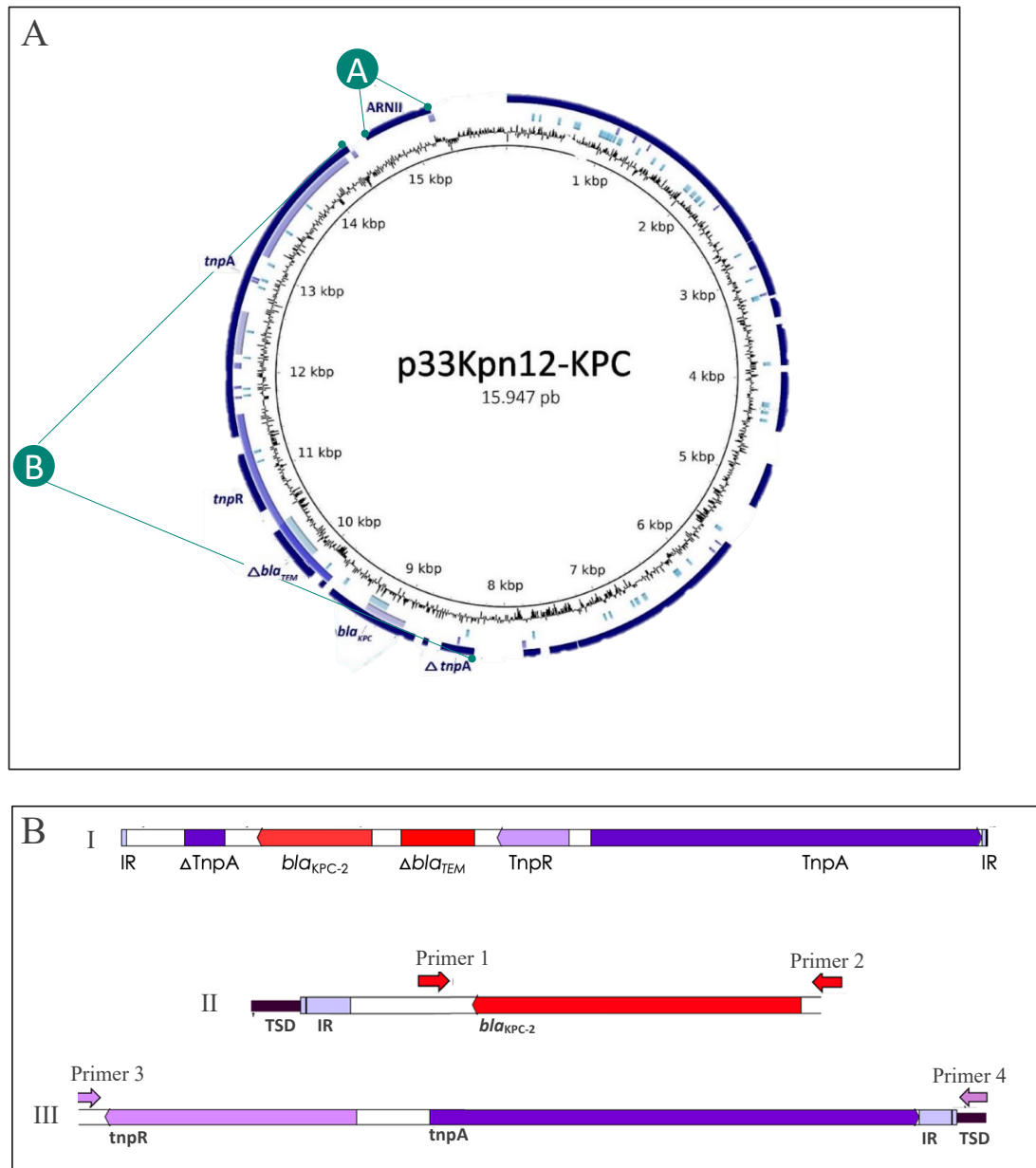


Figura 6 A. Visualización del plásmido p33Kpn12-KPC, los primer usados para la región A presentan un 100% de identidad (Forero Hurtado, 2021) y Visualización del transposón Tn6454 para la región B. B. I. Se observa Tn6454 en su totalidad con todos los elementos que este conlleva. II. Fragmento de Tn6454 el gen *bla*_{KPC-2} alineado con los primers 1 y 2 para la amplificación. III. Fragmento de Tn6454 confirmado por la resolvasa, *tnpR*; la transposasa, *tnpA* y el repetido invertido derecho alineado por los primer 3 y 4 para la amplificación (Forero Hurtado, 2021) (Pérez, 2021).

Código	Secuencia objetivo	Secuencia (5'--> 3')	Tamaño producto (pb)
GN764	ARNII (A)	TTTCGCAGAGCACAGCAACC	497
GN765		GCCCTCCTGACTGAGTTCACA	
GN758 (Primer 1)	Fragmento II	GGTGGTGGGGCCAATAGATGA	839
GN759 (Primer 2)		GTACGCGTTAGCGGCCTGATTACATCCG	
GN761 (Primer 4)	Fragmento III	AACCATGGCTTTCTACTGAACCGCGATC	3869
GN760 (Primer 3)		TGACGCGTGCCACCTGACGTCTAAGAAA	

Tabla 1 Primers utilizados en este estudio con sus respectivas secuencias y características (Forero Hurtado, 2021) (Pérez, 2021).

Para el fragmento ARNII del plásmido p33Kpn12-KPC se utilizaron las siguientes condiciones de temperatura y tiempo: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95°C (3 minutos), 30 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión de 95°C (30 segundos), 55°C (30 segundos) y 72°C (1 minuto), respectivamente, y un ciclo de extensión final de 72°C (5:00) (Forero Hurtado, 2021). Para los Fragmentos I y II de Tn6454 se utilizaron las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 95°C (3 minutos), 30 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión de 95°C (30 segundos), 55°C (30 segundos) y 72°C (4 minutos), respectivamente, y un ciclo de extensión final de 72°C (5:00) (Pérez, 2021).

6.2 Determinación de la Concentración Inhibitoria (CIM)

La concentración mínima inhibitoria (CIM) es la concentración más baja de un fármaco antimicrobiano en la que se inhibe el crecimiento visible de un microorganismo. Se realizó la determinación de la CIM a meropenem, ciprofloxacina y gentamicina en los aislamientos 33Kpn12 y J53. Con el fin de evaluarlos como marcadores de selección para el gen *bla_{KPC}* y para el plásmido p33Kpn12-1. Es decir, las bacterias que crecieran en estos antibióticos más azida de sodio contendrán el plásmido p33Kpn12-1 conjugativo con la inserción de Tn6454 (transposición desde el plásmido pequeño).

Para este ensayo se preparó una suspensión bacteriana equivalente a la turbidez de 0,5 de la escala McFarland, en 3 ml de caldo MH, OD: 0.08 - 0.10 a 625 nm, se realizó una dilución 1:100 en caldo MH (30 µl) y posteriormente en una placa de 96 pocillos (12x8), se sirvió 100 µl de caldo Muller Hilton y 50 µl del antibiótico en diluciones seriadas. Finalmente se añaden 50 µl del inóculo preparado anteriormente. Luego de tener la placa lista se procede a incubar a 37°C por 18 horas. Transcurridas las 18 horas se procedió a la lectura de los resultados.

6.3 Evaluación de la movilización del transposón Tn6454 por medio de conjugación

La evaluación de la movilización de transposón Tn6454, se realizó por medio de ensayos de movilización de plásmidos conjugativos usando diferentes cepas donantes y plásmidos diana para la transposición y posterior conjugación. En la primera estrategia, se empleó al aislamiento 33Kpn12 (donante) y la cepa J53 (receptora, resistente a azida de sodio). La segunda estrategia fue utilizar plásmidos conjugativos de referencia como el plásmido

pR388 (albergado en una *E. coli* K12), como plásmido receptor de la movilización del Tn6454.

6.3.1 Ensayos de conjugación del plásmido p33Kpn12-1 a J53

En esta estrategia la bacteria donadora que se empleó fue el aislamiento de *K. pneumoniae* 33Kpn12, el cual contiene al plásmido conjugativo p33Kpn12-1 y al plásmido no conjugativo p33Kpn12-KPC con presencia del Tn6454. Se realizaron dos ensayos de conjugación en caldo LB (sin presión selectiva) entre *K. pneumoniae* 33Kpn12 y *E. coli* J53, el primero incluía una incubación a 37°C durante 24 horas y posterior cultivo de 100 μ l en agar LB con 100 μ g/ml de azida de sodio y 2 μ g/ml de meropenem, el segundo incluyó pases seriados cada 24 horas durante 15 días, con cultivos diarios en agar LB suplementado con 100 μ g/ml de azida de sodio y 2 μ g/ml de meropenem.

6.3.1.1 Ensayo de conjugación de *K. pneumoniae* y *E. coli* J53 en caldo

Se realizó un cultivo inicial del aislamiento 33Kpn12 de *K. pneumoniae* en 2 ml de medio líquido LB suplementado con MER (2 μ g/ml) y de la cepa J53 de *E. coli* en 2 ml de caldo LB suplementado con NaN₃ (100 μ g/ml), estos se incubaron a 37°C sin agitación durante 24 horas y posteriormente se colocaron en contacto en 1 ml de caldo LB, para lo cual se agregaron 100 μ l del inóculo de 33Kpn12 y 500 μ l del inóculo de J53, se dejaron incubando durante 24 horas a 37°C sin agitación; se tomaron 300 μ l de este cultivo y se inocularon dos tubos nuevos con 1 ml de caldo LB, uno de los tubos estaba suplementado con Meropenem (2 μ g/ml) y con NaN₃ (100 μ g/ml) y el otro tubo estaba suplementado únicamente con NaN₃ (100 μ g/ml), se incubó a 37°C sin agitación durante 24 horas. Finalmente, se sembraron 5 μ l en cajas de agar LB suplementadas con Meropenem (2 μ g/ml) y NaN₃ (100 μ g/ml) (Figura 7), se dejaron incubando por 24 h a 37°C. Posterior a la

incubación, se aislaron las colonias que crecieron en los medios de selección en agar LB suplementadas con MER (2 $\mu\text{g/ml}$) y NaN_3 (100 $\mu\text{g/ml}$) que se dejaron incubando. Finalmente, del aislamiento se realizó extracción de ADN plasmídico por ebullición, y se procedió a realizar PCR de especie de *E.coli*, del gen *bla_{KPC}*, del plásmido p33Kpn12-KPC y de las fracciones del transposón mencionadas anteriormente: Fragmento de Tn6454 y el gen *bla_{KPC}-2* y Fragmento de Tn6454, la resolvasa, *tnpR*; la transposasa, *tnpA* y el repetido invertido derecho.

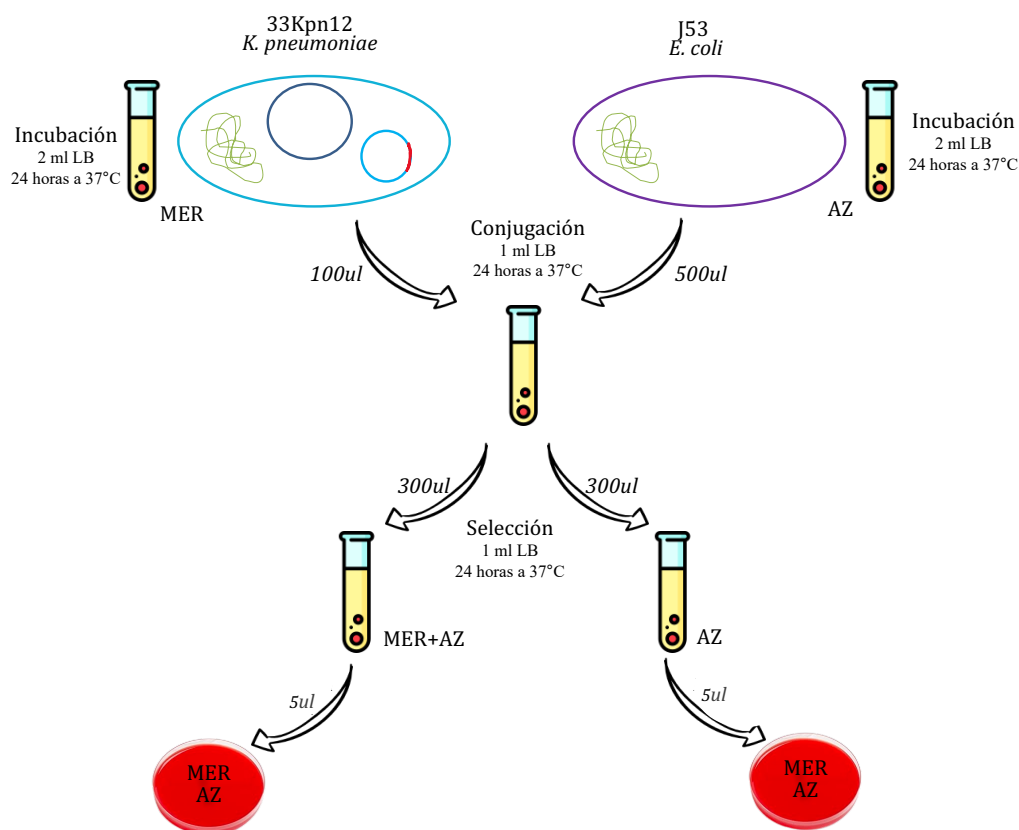


Figura 7 Diseño de Ensayo de conjugación simple sembrando una alícuota del producto final. Elaboración propia.

6.3.1.1.1 Ensayo de conjugación de *K. pneumoniae* y *E. coli* J53 en caldo y siembra masiva del pellet

Se realizó un cultivo inicial del aislamiento 33Kpn12 de *K. pneumoniae* en 2 ml de caldo LB suplementado con MER (2 µg/ml) y del aislamiento J53 de *E. coli* en 2 ml de caldo LB suplementado con NaN₃ (100 µg/ml), se incubó a 37°C sin agitación durante 24 horas. Luego, las cepas se colocaron en contacto en 1 ml de caldo LB, se agregaron 100 µl del inóculo de 33Kpn12 y 500 µl del inóculo de J53, se dejaron incubando durante 24 horas a 37°C sin agitación, pasada la incubación se tomaron 300 µl y se inoculan dos tubos nuevos con 1 ml de caldo LB, uno de los tubos estaba suplementado con Meropenem (2 µg/ml) y NaN₃ (100 µg/ml) y el otro tubo estaba suplementado con NaN₃ (100 µg/ml), se incubaron a 37°C sin agitación durante 24 horas, luego de extraer los 300 µl, se centrifugó el tubo a 4000 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante, dejando solo el pellet resultante del crecimiento bacteriano, este se resuspendió en 20 µl de caldo LB y se sembró en agar LB suplementado con MER (2 µg/ml) y NaN₃ (100 µg/ml). Finalmente, pasada la incubación de los tubos de caldo LB con antibiótico, se realizó la extracción del pellet, centrifugando a 4000 rpm por 5 min, se retiró el sobrenadante, este se resuspendió y se sembró en cajas de agar LB suplementado con MER (2 µg/ml) y NaN₃ (100 µg/ml) (Figura 8), se dejaron incubando por 24 h a 37°C. Posterior a la incubación se aislaron las colonias que crecieron en los medios de selección en agar LB suplementadas con MER (2 µg/ml) más NaN₃ (100 µg/ml) que se dejaron incubando. Finalmente, del aislamiento se realizó extracción de ADN plasmídico por ebullición, y se procedió a realizar PCR de especie de *E.coli* y *K. pneumoniae*, del gen *bla*_{KPC}, del plásmido p33Kpn12-KPC y de las fracciones del transposón mencionadas anteriormente: Fragmento de Tn6454 y el gen *bla*KPC-2 y

Fragmento de Tn6454, la resolvasa, tnpR; la transposasa, tnpA y el repetido invertido derecho.

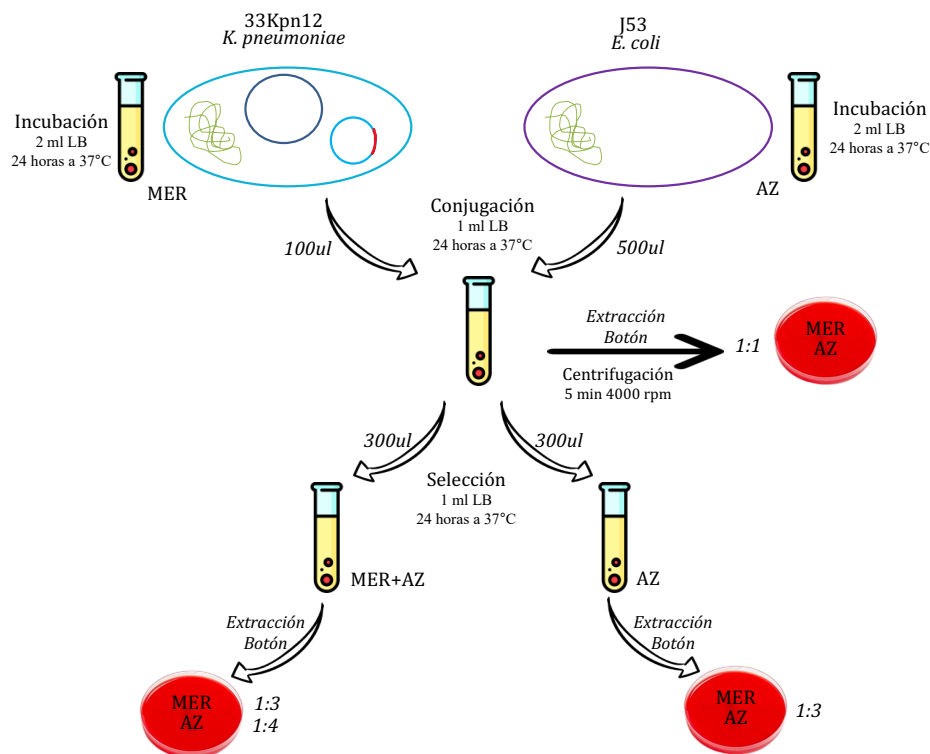


Figura 8 Diseño de Ensayo de conjugación simple sembrando la totalidad del producto final. Elaboración propia.

6.3.1.2 Ensayo de conjugación de *K. pneumoniae* y *E. coli* J53 en caldo mediante pases seriados

Se realizó un cultivo inicial del aislamiento 33Kpn12 de *K. pneumoniae* en caldo LB suplementado con MER a 2 µg/ml, a 37°C sin agitación durante 24 horas y un cultivo inicial del aislamiento J53 de *E. coli* en caldo LB suplementado con NaN₃ a 100 µg/ml, a 37°C sin agitación durante 24 horas. Luego, las cepas se colocaron en contacto en 3 ml de caldo LB durante 24 horas a 37°C sin agitación, este contará como el día 0 (D0), conforme pasen los días se realizaron diluciones de 1:100 para mantener el caldo con los nutrientes

necesarios y se promueva la conjugación y transposición, posterior a la incubación de cada día (Dn), se realizaron siembras masivas de 200 µl en 3 cajas diferentes de agar sólido suplementado con MER a 2 µg/ml más NaN₃ a 100 µg/ml, las cuales fueron incubadas a 37°C. Paralelamente, se realizó el aislamiento en 3 cajas de agar con ciprofloxacina (0.5 µg/ml) y NaN₃ (100 µg/ml), para evaluar la transferencia del plásmido p33Kpn12-1 con la movilización de Tn6454 (*Figura 9*) se dejaron incubando por 24h a 37°C. Pasada la incubación se aislaron las colonias que crecieron en los medios de selección en agar LB suplementadas con MER (2 µg/ml) y NaN₃ (100 µg/ml) que se dejaron incubando. Finalmente, del aislamiento se realizó extracción de ADN plasmídico por ebullición, y se procedió a realizar PCR de especie de *E.coli* y *K. pneumoniae*, del gen *bla*_{KPC}, del plásmido p33Kpn12-KPC y de las fracciones del transposón mencionadas anteriormente: Fragmento de Tn6454 y el gen *bla*KPC-2 y Fragmento de Tn6454, la resolvasa, *tnpR*; la transposasa, *tnpA* y el repetido invertido derecho.

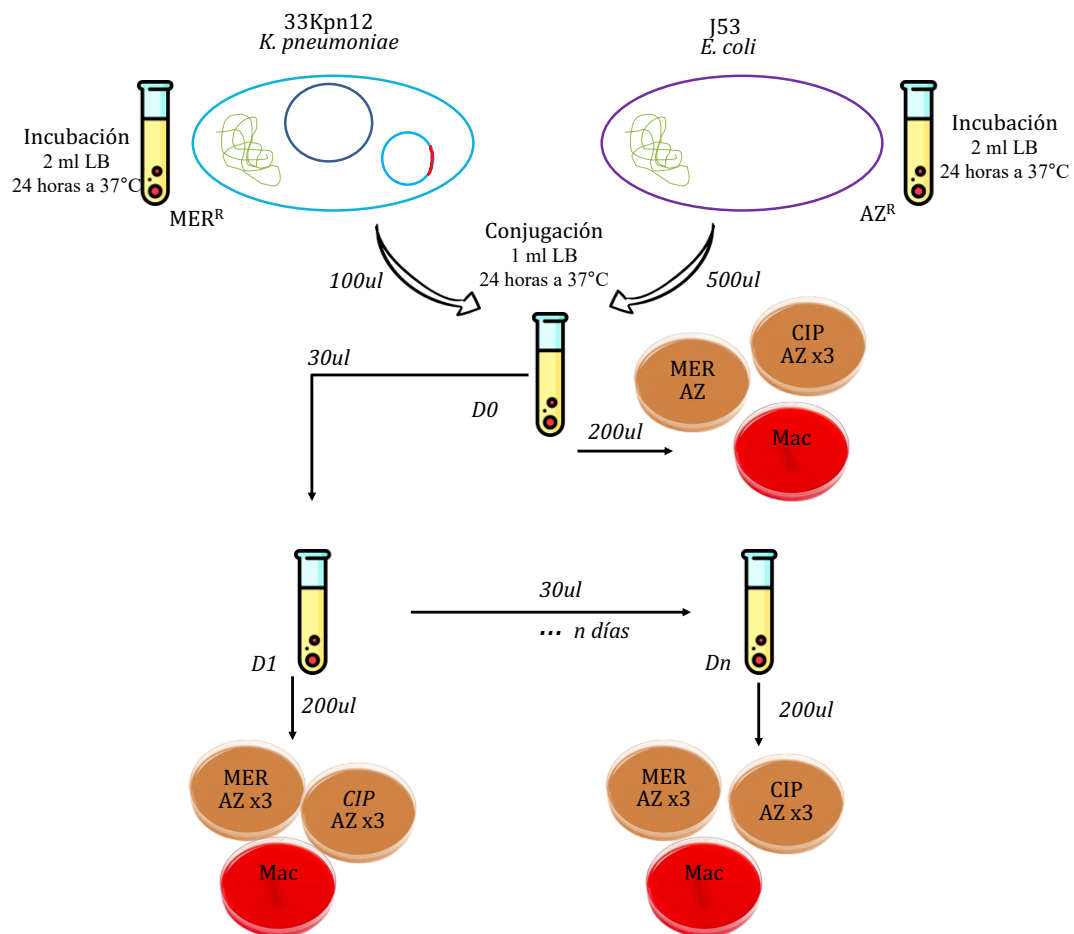


Figura 9 Diseño de Ensayo de conjugación por pases seriados sembrando 200 μ l del producto final. Elaboración propia

6.3.2 Ensayo de conjugación de *E. coli* K12 con R388 transformada con p33Kpn12-KPC y *E. coli* J53

En esta estrategia se empleó a la cepa de *E. coli* K12, con el plásmido R388, el cual le confiere resistencia a los antibióticos trimetoprim y sulfametoxazol, debido a que presenta los genes *sulI* y *dhfr*. El plásmido R388 es muy usado para ensayos de conjugación, ya que este plásmido usa la mitad de sus genes para el proceso de conjugación, adicionalmente se ha reportado su capacidad de conjugarse a todas las especies utilizadas, aunque con frecuencias de conjugación bastante diferentes (Campo, 2016). En la *Figura 10* se observa la frecuencia de conjugación de pR388, en la que se distingue que los eventos de

conjugación tienen mejores resultados de conjugación cuando la bacteria donadora y receptora es *E. coli* (Campo, 2016).

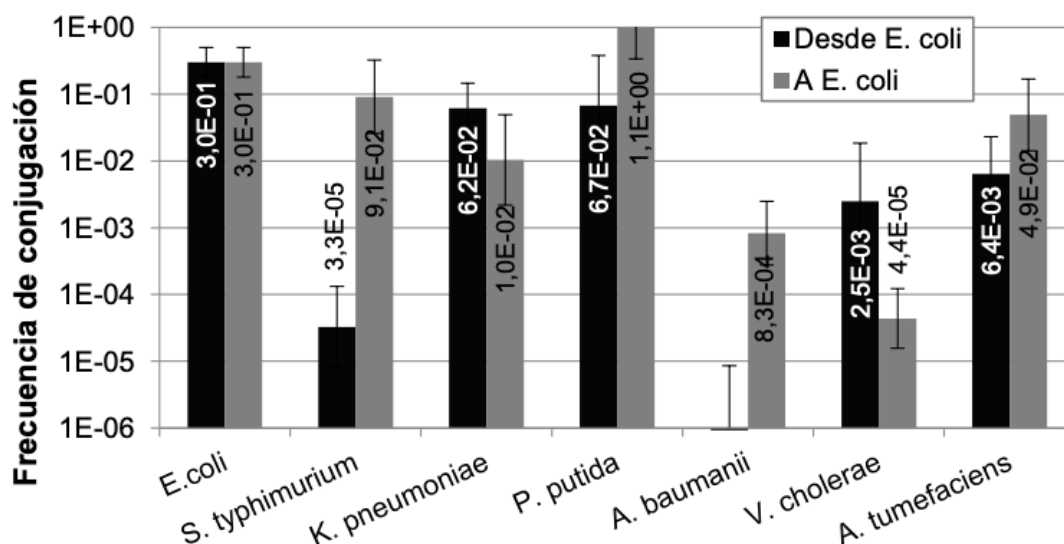


Figura 10 Frecuencias de conjugación de R388. En negro se representan las frecuencias de conjugación para R388 desde *E. coli* hacia otras bacterias y en gris se representan las frecuencias obtenidas en la conjugación inversa (desde las bacterias hacia *E. coli*).

Para la realización de este ensayo se requirió la presencia del plásmido p33Kpn12-KPC al interior de la cepa donadora (K12 *E. coli*), por lo cual se realizaron procedimientos de electrocompetencia y electroporación a la cepa K12. Adicionalmente el ensayo de conjugación se realizó en medio sólido usando filtros de 0.22 μ L.

Inicialmente, se realizó la extracción plasmídica de la cepa 33Kpn12 con el Kit NucleoSpin® Plasmid QuickPure siguiendo las indicaciones descritas en el protocolo, posterior a la extracción de los plásmidos, se procedió a hacer la cepa K12 de *E. coli* competente para poder recibir el plásmido p33Kpn12-KPC.

Para la preparación de células electrocompetentes, las bacterias se cultivaron hasta una $DO_{600} = 0,5 - 0,6$ y se sedimentaron mediante centrifugación a 4 °C. Se aplicaron dos series

de lavados y centrifugaciones de 4.000 rpm y un lavado final en 1/50 de volumen de glicerol al 10% a 4°C. Las células se resuspendieron en 1/500 vol de glicerol al 10% y se dividieron en alícuotas de 50 µl. Las alícuotas se congelaron a -80°C y se mantuvieron hasta su uso. Se mezclaron alícuotas con 10 ng de ADN plasmídico en una cubeta Gene Pulser® de 0,2 cm (BioRad) y se sometieron a un pulso eléctrico (2,5 kV, 25 µF y 200 Ω) en un Mi Gene Pulser Xcell Electroporation Systems (BioRad). Las células sometidas a electroporación se añadieron a 1 ml de LB y se incubaron con agitación a 37 °C. Después de la incubación, las células se colocaron en placas en medios que contenían antibióticos (*Figura 11 A.*).

Posterior a obtener la cepa K12 transformado con la totalidad de 3 plásmidos en su interior se procedió a iniciar el ensayo de conjugación. El protocolo de ensayos de conjugación que se usó como referencia fue el de Samperio, et al. (2021). El cual procede, cultivando las cepas donantes y receptoras en 5ml de caldo BHI suplementado con antibióticos, SXT (8/152 µg/ml) y MER (2 µg/ml) para la donante y AZ (100 µg/ml) para la receptora. Posterior a la incubación se hace un lavado del antibiótico, centrifugando el producto de crecimiento a 4000 rpm por 5 min, retirando el excedente y resuspendiendo el pellet en 5 ml de caldo BHI.

La conjugación inicio poniendo en contacto 100 µl de la cepa donadora y receptora, este paso se realizó 6 veces. A continuación, la mezcla bacteriana se lavó de nuevo con BHI, se resuspendió en 20 µL de BHI y se transfirió a un filtro de conjugación (0,22 µm de nitrocelulosa, Millipore) en agar BHI sin presión selectiva, este se dejó incubando a 37°C por 24 h. Luego, los filtros se resuspendieron en caldo BHI, de igual manera se realizaron lavados al agar. Del producto recolectado del lavado y la resuspensión de los filtros se

extrajo el pellet bacteriano y se sembró en medios selectivos (SXT8/152 $\mu\text{g/ml}$) y MER (2 $\mu\text{g/ml}$) y AZ(100 $\mu\text{g/ml}$)). (*Figura 11 B.*)

7 RESULTADOS

7.1 Confirmación de la presencia de Tn6454 en el aislamiento 33Kpn12

Como se mencionó anteriormente, el fin de estos resultados es confirmar la resistencia a meropenem y la presencia de los elementos de interés (p33Kpn12-KPC, Tn6454 y gen *bla_{KPC}*) dentro de la cepa 33Kpn12 de *K. pneumoniae*. En la *Figura 12A* se muestra un crecimiento disminuido de la cepa 33Kpn12 en medio suplementado con meropenem en diferentes concentraciones (1µg/ml, 2µg/ml, 4µg/ml), debido a este crecimiento reducido, se realizó la confirmación en medios suplementados con ceftazidima, una cefalosporina a la que la cepa es resistente por los genes *bla_{KPC}* presentes en el plásmido p33Kpn12-KPC y los genes *bla_{CTX-M-1}* presentes en el plásmido p33Kpn12-1, para corroborar indirectamente la conservación de los genes de resistencia a carbapenémicos *Figura 12B*. Posterior a esto se realizó la confirmación molecular por medio de la técnica de PCR convencional, como se observa en la *Figura 13*, la confirmación de la especie *K. pneumoniae* por la amplificación de un fragmento del gen *khe*, la presencia del gen *bla_{KPC}*, la presencia del plásmido p33Kpn12-KPC por la amplificación del gen ARNII y la presencia de los fragmentos I (Fragmento de Tn6454 y el gen *bla_{KPC}*-2) y II (Fragmento de Tn6454, la resolvasa, *tnpR*; la transposasa, *tnpA* y el repetido invertido derecho).

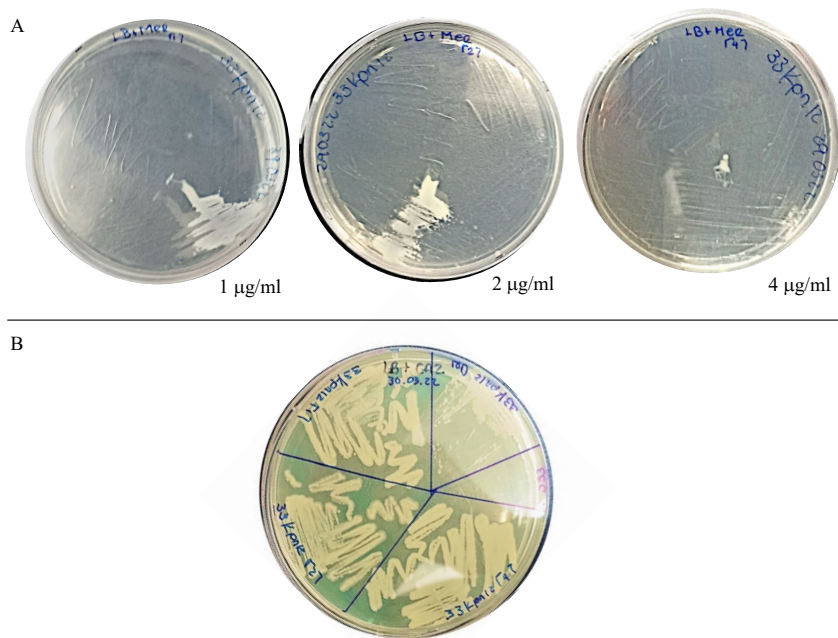


Figura 12 A. Crecimiento de la cepa 33Kpn12 diferentes concentraciones de meropenem. B. Crecimiento de la cepa 33Kpn12 en ceftazidima

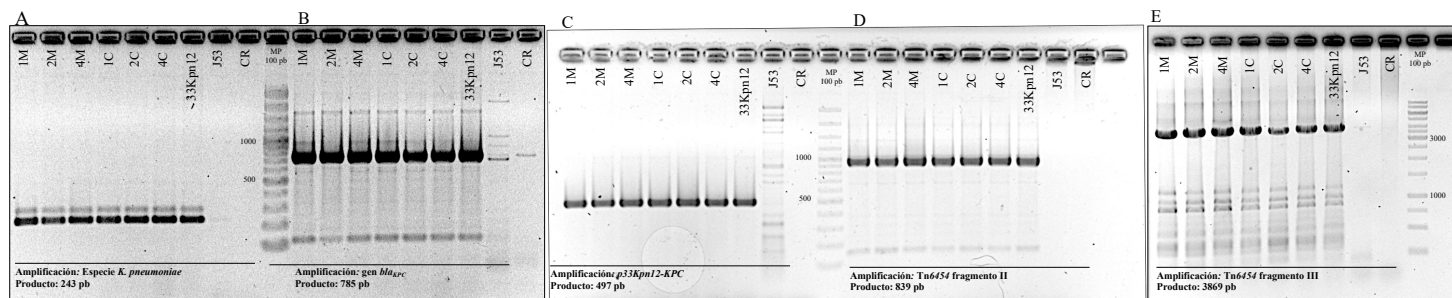


Figura 13 Amplificaciones de colonias aisladas de la cepa 33Kpn12. A. PCR para identificación de especie *K. pneumoniae*. B. Amplificación del gen *bla*_{KPC-2}. C. Amplificación del gen *ARNII* para identificación del plásmido *p33Kpn12-KPC*. D. Amplificación de los genes del fragmento II de *Tn6454* que constan del gen *bla*_{KPC-2} y una porción del transposón. E. Amplificación de los genes del fragmento III de *Tn6454* que constan de la resolvasa, transposasa, el IRL y el TSD. **Convenciones** 1M: colonia crecida en medio suplementado con meropenem a una concentración de 1 µg/ml 2M: colonia crecida en medio suplementado con meropenem a una concentración de 2 µg/ml 4M: colonia crecida en medio suplementado con meropenem a una concentración de 4 µg/ml 1C: colonia crecida en medio suplementado con CAZ proveniente del aislado en meropenem a una concentración de 1 µg/ml 2C: colonia crecida en medio suplementado con CAZ proveniente del aislado en meropenem a una concentración de 2 µg/ml 4C: colonia crecida en medio suplementado con CAZ proveniente del aislado en meropenem a una concentración de 4 µg/ml.

Los resultados de amplificaciones que se muestran en la *Figura 14*, demuestran que la cepa 33Kpn12 de *K.pneumoniae*, presenta el gen que otorga resistencia a β -lactámicos (*bla_{KPC-2}*), que se encuentra al interior de *Tn6454* el cual está unido al plásmido p33Kpn12-KPC. Esto concuerda con lo mencionado en la investigación de Abril et al, 2021, en la que se identifica la plataforma de movilización *Tn6454* como un nuevo transposón putativo, presente en el aislamiento 33Kpn12, insertado en el plásmido p33Kpn12-KPC, este fue identificado como una nueva isoforma de NTE_{KPC-II}.

7.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

Como resultados de esta fase metodológica, se obtiene la concentración de los antibióticos de meropenem, ciprofloxacina y gentamicina, las cuales permitan eliminar los aislamientos 33Kpn12 y J53, dejando sobrevivir la bacteria receptora transconjugante (J53). La concentración de Meropenem realiza la selección de las bacterias que presenten el gen *bla_{KPC-2}*, ubicado al interior de *Tn6454*, puesto que este otorga resistencia a antibióticos β -lactámicos, por otro lado las concentraciones de Ciprofloxacina y Gentamicina van a seleccionar las bacterias que presenten los genes que otorguen resistencia aminoglucósidos y las fluoroquinolonas (genes, *aadA16*, *aph(6)Id*, *aac(6')-Ib-cr*) que están ubicados en el p33Kpn12-1.

En la *Figura 14* se observa el resultado para la CIM de meropenem a las cepas 33Kpn12 está dentro del rango de resistente, determinado por el CLSI, con un valor de 8 $\mu\text{g/ml}$ y J53 dentro del rango de sensibilidad, determinado por el CLSI, con un valor de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, a partir de estos resultados entre las dos cepas se determinó la concentración ideal de

meropenem para usar como marcador de selección, la cual fue de 2 µg/ml, siendo esta una concentración en la que su CIM aún permanece dentro de los rangos de resistencia establecidos por el CLSI.

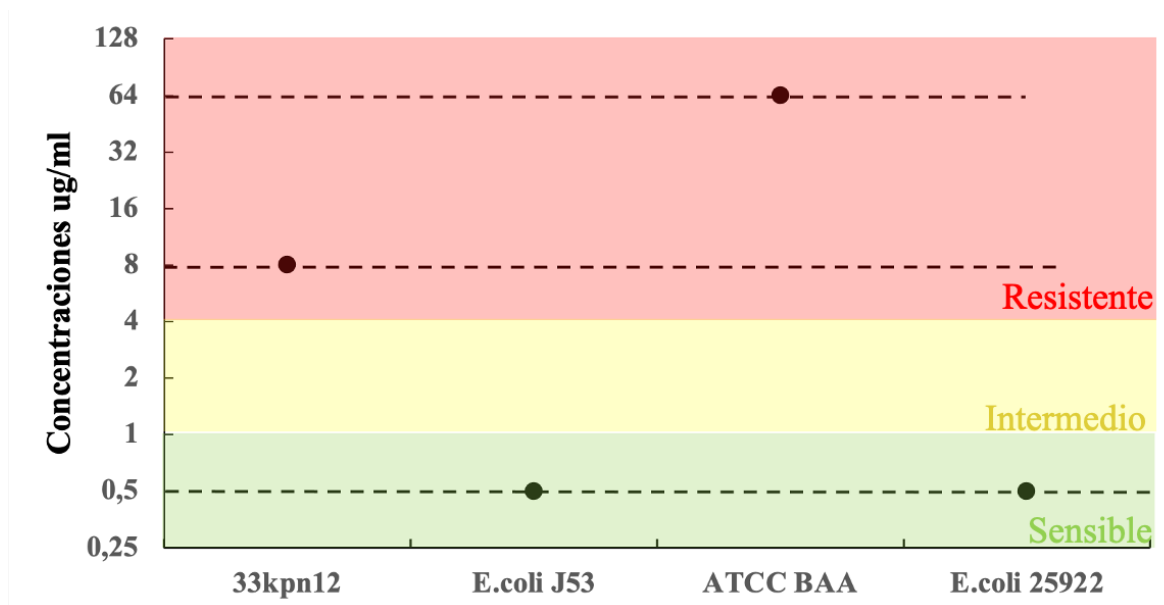


Figura 14 CIM de meropenem para las cepas 33Kpn12 de *K. pneumoniae* y J53 *E. coli*. Los diferentes colores hacen referencia a los rangos de resistencia determinados por el CLSI. Verde: rango de sensibilidad, Amarillo: rango intermedio y Rojo: rango de resistencia

Para el caso de ciprofloxacina y gentamicina, antibióticos que harán de las veces de marcador de selección de bacterias transconjugantes que presenten el plásmido p33Kpn12-1, debido a la presencia de los genes *aac(6')-Ib-cr*. La Figura 15 se observa, que la cepa 33kpn12 está dentro del rango de resistente tomando como referencia el punto de corte de detección de ciprofloxacina proporcionado por CLSI, dando como resultado 4 µg/ml, por el contrario para la cepa de *E.coli* J53 se encuentra dentro de un rango sensible, siendo su resultado menor a 0.25 µg/ml. Posteriormente, se decidió que la concentración apropiada para usar el antibiótico como marcador de selección es de 0.5 µg/ml siendo esta una

concentración en la que su CIM aún permanece dentro de los rangos de resistencia establecidos por el CLSI.

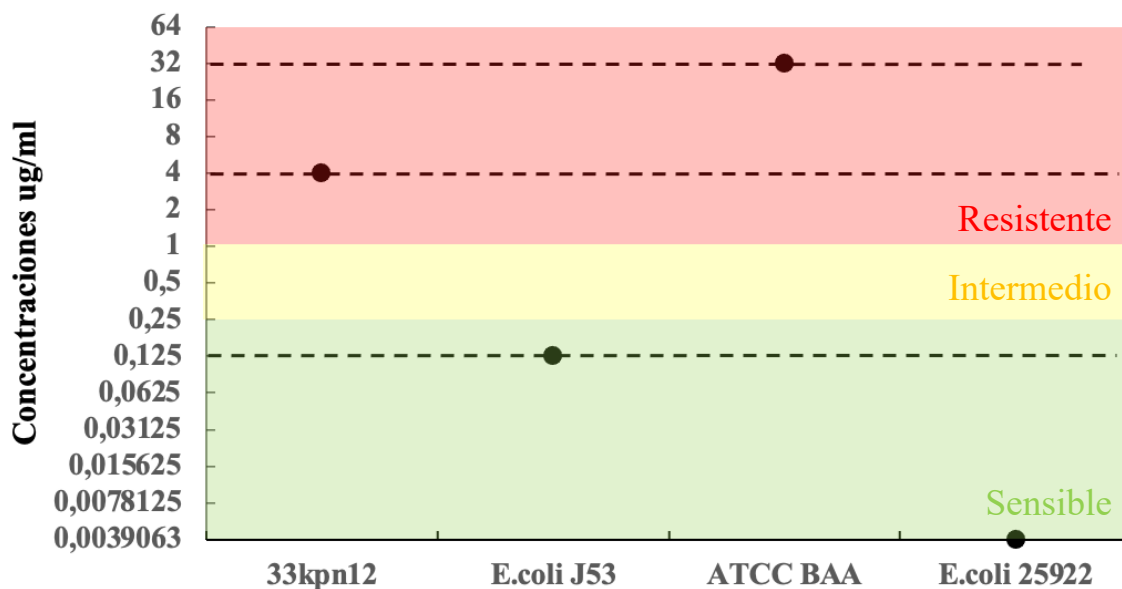


Figura 15 CIM de ciprofloxacina para las cepas 33Kpn12 de *K. pneumoniae* y J53 *E. coli*. Los diferentes colores hacen referencia a los rangos de resistencia determinados por el CLSI. Verde: rango de sensibilidad, Amarillo: rango intermedio y Rojo: rango de resistencia

Finalmente, para gentamicina se observa en la *Figura 16* que la cepa 33kpn12 está dentro del rango sensible tomando como referencia el punto de corte de detección de gentamicina proporcionado por CLSI; debido a que la cepa 33Kpn12 no es resistente al antibiótico, este se descarta como opción de marcador de selección.

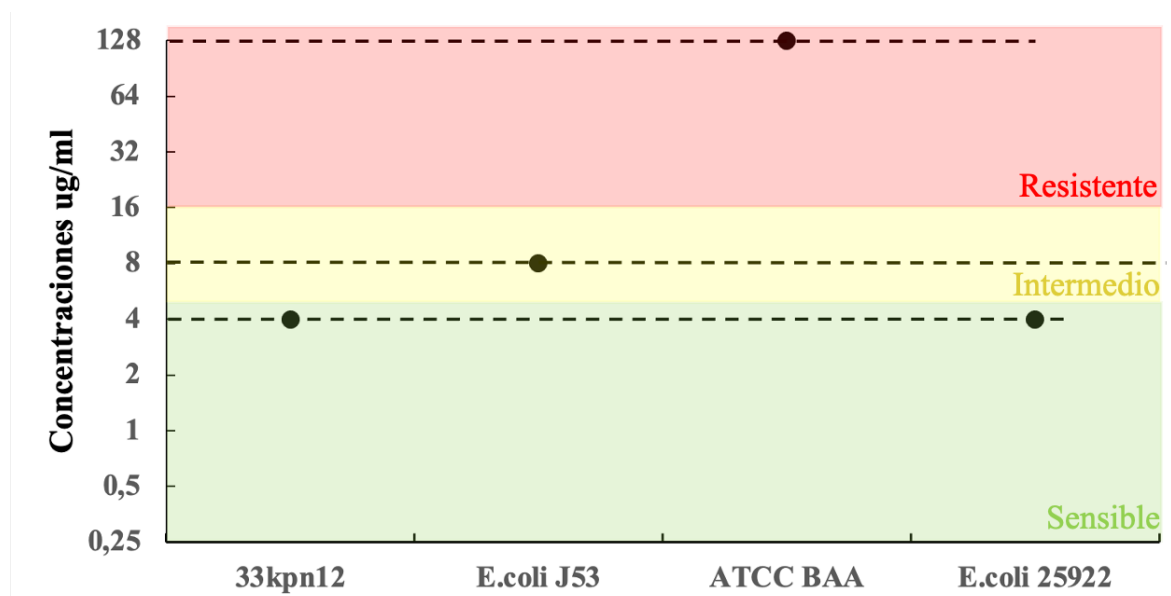


Figura 16 CIM de gentamicina para las cepas 33Kpn12 de *K. pneumoniae* y J53 *E. coli*. Los diferentes colores hacen referencia a los rangos de resistencia determinados por el CLSI. Verde: rango de sensibilidad, Amarillo: rango intermedio y Rojo: rango de resistencia

7.3 Evaluación de la movilización del transposón Tn6454 por medio de conjugación

7.3.1 Ensayos de conjugación del plásmido p33Kpn12-1 a J53

Como se mencionó anteriormente en la sección de metodología, esta primera estrategia se llevó a cabo con la cepa 33Kpn12 como bacteria donadora y la cepa J53 como bacteria receptora. Adicionalmente todos los ensayos probados en esta estrategia se hicieron en medio de cultivo líquido.

7.3.1.1 Ensayo de conjugación de *K. pneumoniae* y *E. coli* J53 en caldo

Como resultado se obtuvo un crecimiento bacteriano en medios de cultivos suplementados con Meropenem y Azida de sodio, de ese crecimiento se realizó aislamiento de colonias en medios de cultivos suplementados con Meropenem y Azida de sodio. El resultado del aislamiento de las colonias se muestra en la *Figura 17 A*, en el que se observa el medio de cultivo fraccionado en 32 espacios, en las posiciones 1, 7,9,12,14 y 15 se

observa un crecimiento bacteriano, sugiriendo, que estas colonias podrían poseer el gen *bla_{KPC-2}*, y a su vez el Tn6454. Posteriormente a los crecimientos en esas posiciones se le realizó extracción de ADN por Boilling y se realizó confirmación de especie por medio de PCR.

En la *Figura 17 B*, se observa el resultado de la PCR, en la que se amplifica el gen *uidA* que es específico para la especie *E. coli*. Los carriles del gel esta nombrado según las posiciones en las que hubo un posible evento de transconjugacion y transposición. Finalmente se evidencia que no hubo amplificación por parte del gen, lo que nos confirma la ausencia *E.coli*, y se descarta el supuesto de transconjugacion y transposición, debido a que los aislados no son la bacteria receptora.

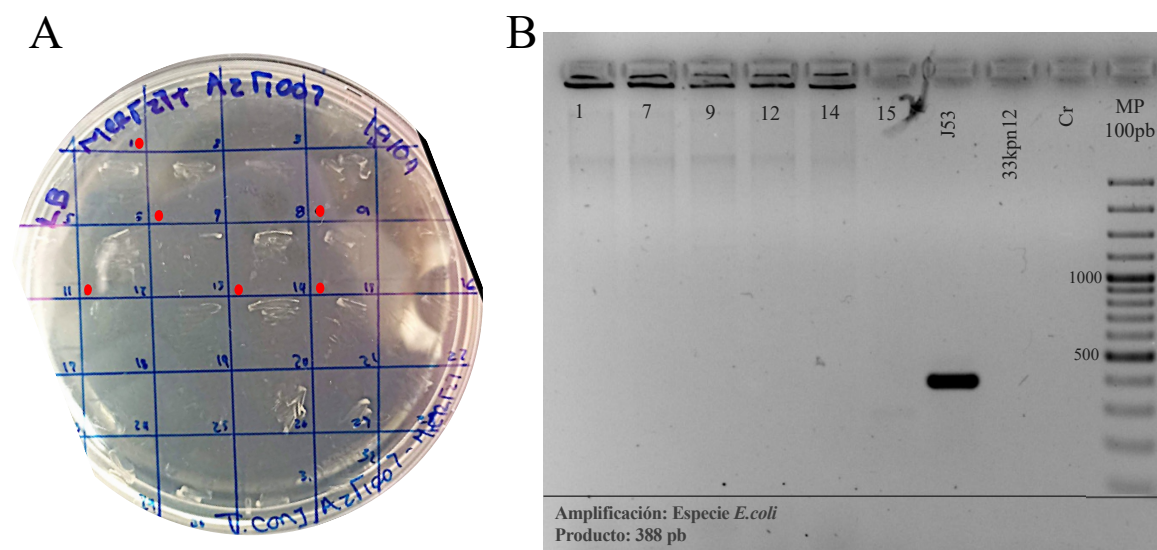


Figura 17 Resultado del ensayo de conjugación simple, por aislamiento a partir de una alícuota del producto final. A. Posibles aislamientos de transconjugantes en medio suplementado con meropenem y Azida de Sodio. B. Amplificación del gen *uidA*, para identificación de la especie *E.coli*.

7.3.1.1.1 Ensayo de conjugación de *K. pneumoniae* y *E. coli* J53 en caldo y siembra masiva del pellet

Para este ensayo, se modificó la cantidad del inóculo del producto bacteriano pasadas las 24h de haber estado en contacto las bacterias. El cambio de extraer el pellet y aislarlo en su totalidad, se debe a aumentar la probabilidad de encontrar la colonia transconjugante, a diferencia del ensayo anterior que la probabilidad se reducía al solo tomar y aislar 5 µL del producto final pasadas las 24 h de haber estado en contacto las bacterias.

Finalmente, como resultado, luego de haber aislado el pellet en su totalidad, se obtuvo un crecimiento bacteriano que fue nuevamente aislado por colonia, como se muestra en la *Figura 18*, se realizaron 56 aislamientos en cajas de medio suplementado con Meropenem y Azida de sodio, en la *Figura 18* las secciones con un punto rojo son crecimientos aparentes de la colonia, indicando un posible evento de conjugación hacia la cepa J53.

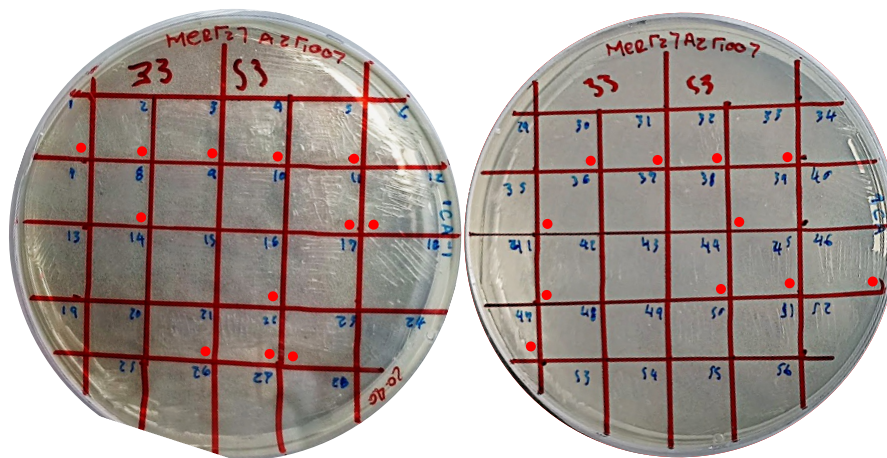


Figura 18 Aislamientos de posibles colonias transconjugantes en medio suplementado con meropenem y azida de sodio.

Finalmente, se realiza la confirmación de especie a los crecimientos mencionados anteriormente. En la *Figura 19A*, se muestra la confirmación para especie en la que se amplificó el gen *uidA* y *khe* específicos para las especies *E. coli* y *K. pneumoniae* respectivamente, se puede observar que las colonias que están de los carriles 2 a 20 presenta una amplificación sobre el nivel de 388 pb, lo que podría sugerir que estos aislamientos son de la especie *E. coli*. En cuanto a la *Figura 19B*, muestra la confirmación para la presencia del gen *bla_{KPC-2}*, se puede observar que en ninguno de los carriles de interés hay una banda al nivel de 785 pb, indicando que no hubo una posible movilización del gen; sugiriendo un falso positivo para las colonias que crecieron en el medio de cultivo.

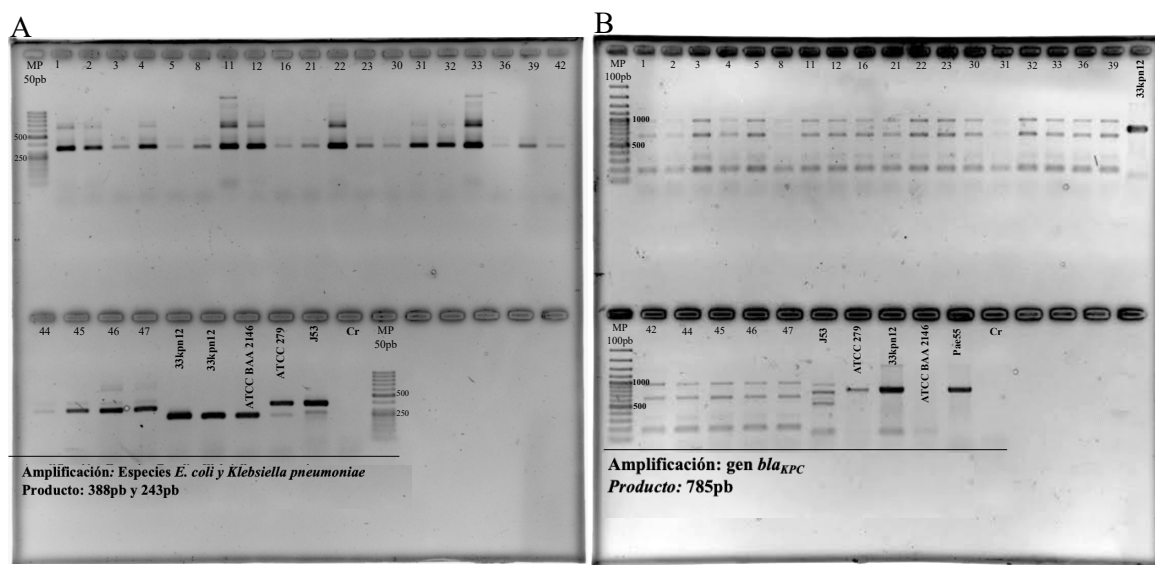


Figura 19 PCR de confirmación para las bacterias de interés. A. Amplificación del gen *uidA* y *khe*, para identificación de la especie *E. coli* y *K. pneumoniae*. B. Amplificación de gen *bla_{KPC-2}* para confirmación de este dentro de la cepa de interés.

7.3.1.2 Ensayo de conjugación de *K. pneumoniae* y *E. coli* J53 en caldo mediante pases seriados

Para este ensayo se planteó el pase seriado, para aumentar la probabilidad de que sucediera el evento de conjugación, por tal razón se hicieron pases diarios y sembrados 200 µL del producto diario en agares con marcadores de selección. Los pases se realizaron durante 15 días de los cuales solo hubo crecimiento bacteriano en medios con marcador de selección durante los días del 0 al 4 como se muestra en la *Figura 20*.

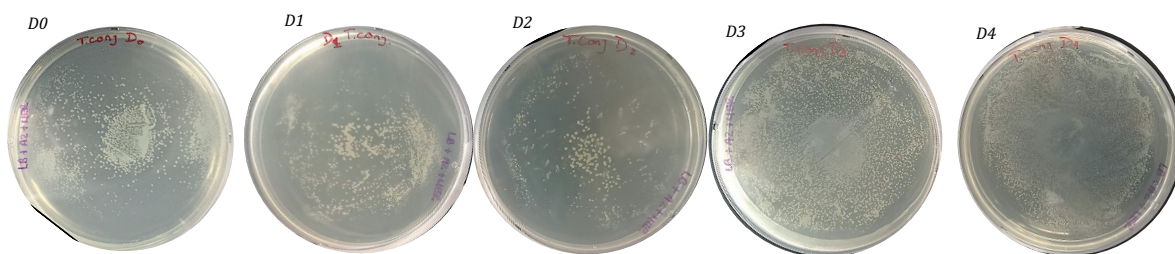


Figura 20 Crecimiento bacteriano en medio con marcador de selección (Meropenem y Azida de Sodio) durante los días 0 al 4.

Continuando con la metodología se realizó aislamiento de colonias de los días 1, 2, 3 y 4. En la *Figura 22* se muestran 30 aislamientos de cada día en agar suplementado con meropenem y azida de sodio, se observa un crecimiento en las parcelas 3, 5, 11, 26, 27 del día 1, y crecimiento en la parcela 5 del día 2. Sugiriendo un posible evento de conjugación dirigido a la cepa J53.

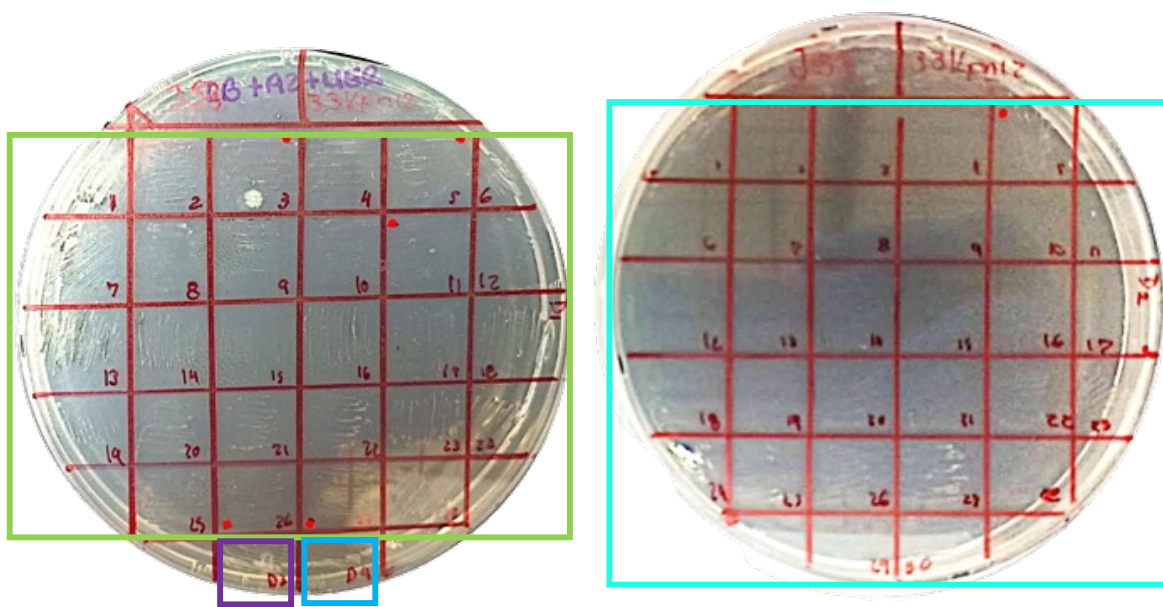


Figura 21 Aislamientos de posibles colonias transconjugantes en medio suplementado con meropenem y azida de sodio. Los recuadros de colores hacen referencia a las colonias aisladas de los diferentes días. Verde: día 1, Turquesa: día 2, Morado: día 3 y, Azul: día 4

A los aislamientos que crecieron en el medio de selección, se les procedió a realizar la confirmación de especie y de la presencia del gen *bla_{KPC-2}*. En la *Figura 22 A*, se observa la amplificación del gen *uidA* para identificación de *E. coli* en todos los carriles, en el caso del carril 2, perteneciente a la colonia aislada en la parcela 3 del día 1, amplificó el gen *khe* y *uidA*, mostrándonos la pretendencia de estas dos especies dentro de la parcela. En la *Figura 22 B*, se observa la amplificación del gen *bla_{KPC-2}* solo para la colonia aislada en la parcela 3 (carril 2), esta amplificación de este se atribuye a la presencia de *K. pneumoniae* dentro de la parcela. Para el resto de los casos no hay una amplificación del gen *bla_{KPC-2}* sugiriendo un falso positivo para las colonias que crecieron en el medio de cultivo con marcadores de selección.

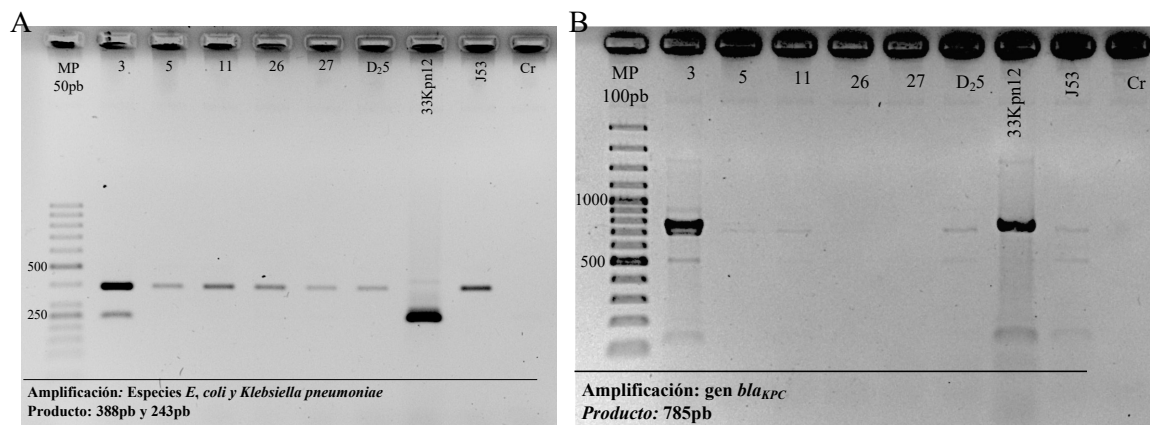


Figura 22 PCR de confirmación para las bacterias de interés. A. Amplificación del gen *uidA* y *khe*, para identificación de la especie *E.coli* y *K. pneumoniae*. B. Amplificación de gen *bla_{KPC-2}* para confirmación de este dentro de la cepa de interés.

7.3.2 Ensayo de conjugación de *E. coli* K12 con R388 transformada con p33Kpn12-KPC y *E. coli* J53

Como se menciona en la metodología, en esta estrategia se empleó a la cepa de *E. coli* K12, con el plásmido R388, que es conocido por su facilidad de conjugación y adicionalmente confiere resistencia a los antibióticos Trimetoprim y sulfametoxazol debido a que presenta los genes *sul1* y *dhfr*. Ya a que el propósito del trabajo es analizar la movilidad de Tn6454 y la nueva cepa no presenta el plásmido p33Kpn12-KPC se procedió a realiza una electroporación de K12, para poder ingresar este plásmido p33Kpn12-KPC dentro de la nueva cepa.

En la *Figura 23*, se muestra la confirmación de la electroporación de la cepa K12, en la figura se muestra el resultado de diferentes amplificaciones, por tal razón la figura muestra resultados para presencia del plásmido R388, del gen *bla_{KPC-2}*, el fragmento de Tn6454 que está unido al plásmido p33Kpn12-KPC, el plásmido p33Kpn12-KPC, el fragmento de Tn6454 que presenta el gen *bla_{KPC-2}*, y finalmente el plásmido p33Kpn12-1. Los resultados

fueron positivos para todas las amplificaciones que se realizaron a la cepa K12 Transformada (K12 T).

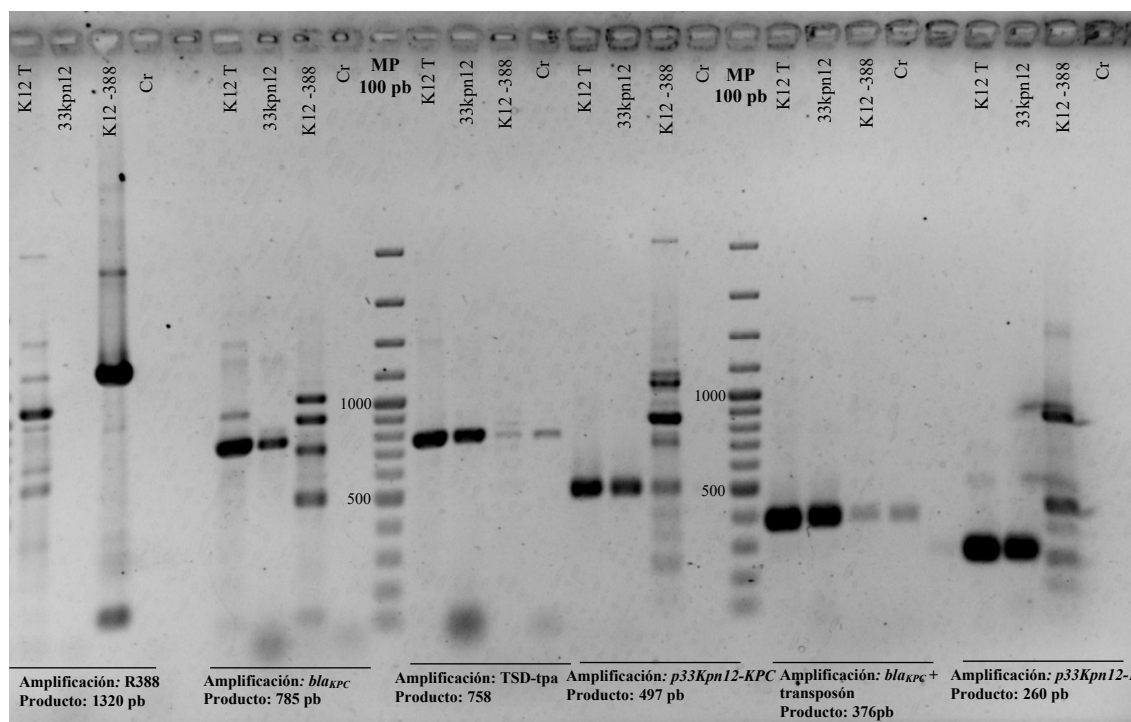


Figura 23. Amplificaciones realizadas a la K12 transformada.

Posterior a la confirmación de que los elementos de interés (pR388, p33Kpn12-KPC, p33Kpn12-KPC, gen *bla_{KPC-2}* y Tn6454) están presentes dentro de la cepa K12 T, se inició con el ensayo de conjugación, el cual se diferencia de los demás ensayos por usar filtro en medio sólido durante el evento de conjugación. El aislado que se realizó fue por agrupación de colonias, debido a que el tamaño de las colonias no favorecía el aislamiento de una sola. Teniendo en cuenta lo anterior los resultados y análisis se realizan a nivel de población de colonias. La *Figura 24* muestra los resultados obtenidos de aislamientos poblacionales con los marcadores de selección presentes, se obtuvo un total de 18 aislamientos poblacionales, los cuales sugieren un posible evento de transconjugación.

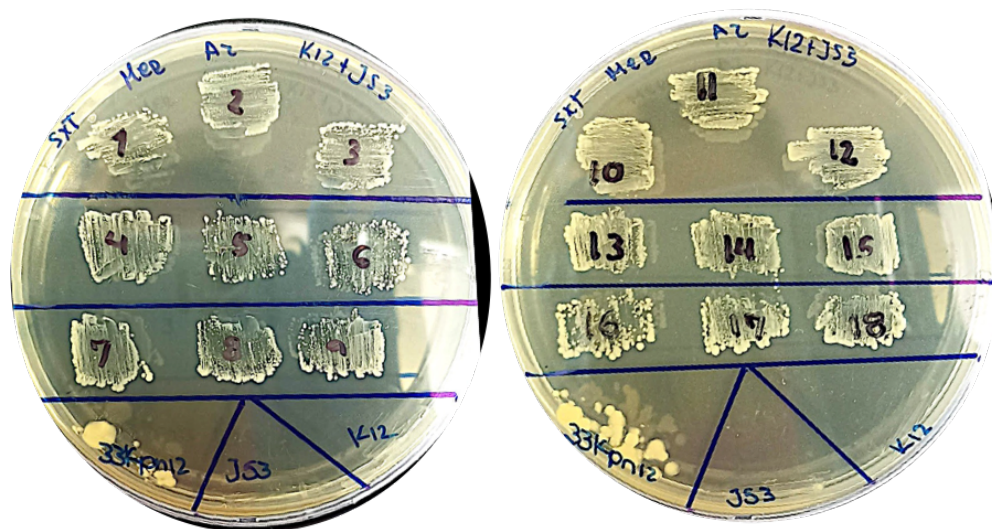


Figura 24 Aislamiento de posibles agrupaciones poblacionales resistentes a Trimetoprim-sulfametoxazol, Meropenem y Azida de Sodio

Posterior al aislamiento se realizaron las confirmaciones por medio de PCR para las 18 agrupaciones poblacionales aislados, en la *Figura 25*, se puede observar los resultados de las PCR, para la agrupación aislada 11 de la cual se sugiere un evento de transconjugación en la población (los resultados de todas las poblaciones aisladas se observan en el ANEXO A), este agrupamiento poblacional que es resistente a meropenem, Trimetoprim-sulfametoxazol y azida de sodio, no muestra ninguna amplificación para el plásmido pR388, indicando que no hubo ninguna conjugación por parte de este plásmido, por otro lado se observa una franja tenue, sugiriendo un resultado positivo para la movilización del plásmido p33Kpn12-1, obteniendo así una población que se ha conjugado y ha recibido uno de los plásmidos de la cepa donadora K12, adicionalmente no se observa una amplificación para el fragmento de Tn6454 que consta del gen *TnpA* y el TSD 5', lo que indica que el transposón ya no se encuentra unido al plásmido p33Kpn12-KPC, por último la amplificación para el fragmento de Tn6454 que presenta el gen *bla_{KPC}* y *bla_{TEM}*, muestra un

resultado positivo, lo que confirma la presencia del transposón y del gen *bla*_{KPC-2} entre la agrupación poblacional 11.

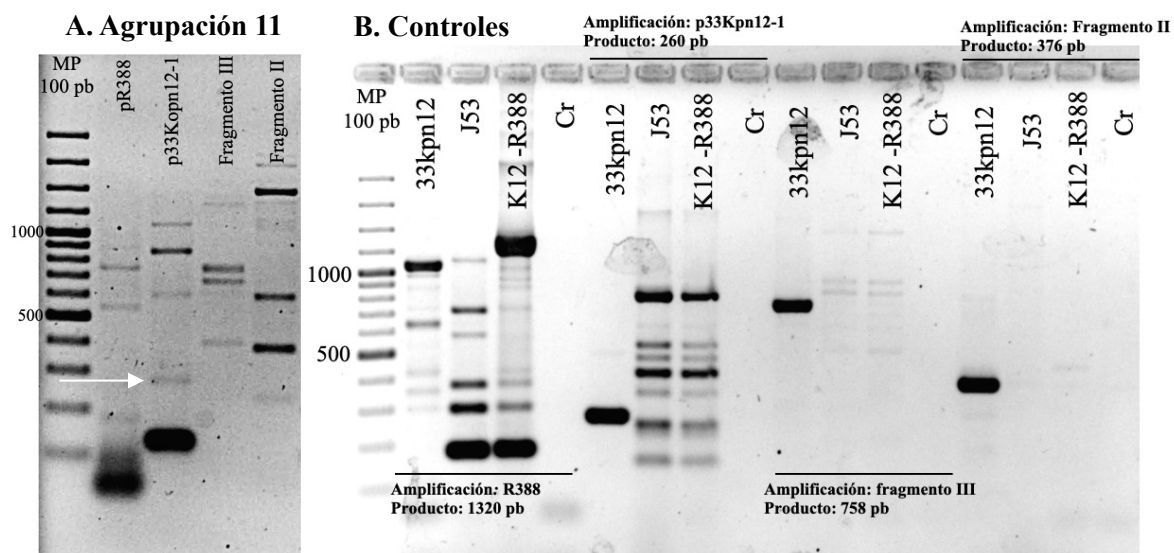


Figura 25 A. Amplificaciones de los fragmentos de interés plásmido R388 y p33Kpn12-1, fragmentos de Tn6454 en la agrupación poblacional 11. **B.** Controles para los fragmentos de interés

8 DISCUSIÓN

La prevalencia de infecciones bacterianas portadoras de KPC ha aumentado debido a la gran diseminación de este gen de resistencia, siendo *Klebsiella pneumoniae* una de las principales productoras de esta carbapenemasa, convirtiéndose en uno de los patógenos más importantes y de mayor impacto clínico a nivel mundial. Las bacterias productoras de KPC pueden hidrolizar los carbapenémicos y la mayoría de los antibióticos β -lactámicos, esta enzima es codificada por el gen *bla_{KPC-2}* que es diseminado a través de transposones (Roy & Partridge, 2017). Los mecanismos de movilización de DNA juegan un papel fundamental en la adaptación de las bacterias a su ambiente, y significativamente cuando están frente a moléculas mortales como los antibióticos. La existencia de diferentes y diversos mecanismos de movilización de DNA intra e interespecies ha permitido la rápida diseminación de genes de resistencia desde bacterias del ambiente hacia bacterias que circulan en las instituciones de salud. Respecto a la movilización del gen *bla_{KPC-2}*, el principal y más frecuente mecanismo ha sido el Tn4401, un transposón de 10 Kpb de la familia Tn3 y con características muy importantes como su alta frecuencia de transposición, la falta de especificidad de inserción, es decir, con capacidad de insertarse en diferentes estructuras, e insertarse y permanecer dentro de diferentes especies bacterianas (Cuzon, Naas, & Nordmann, 2011). La presencia de estos mecanismos de movilización influye directamente en el funcionamiento de las bacterias, su resistencia y su evolución genética.

En este estudio se analizó la posible movilización del *bla_{KPC-2}* a través del Tn6454, una nueva plataforma genética identificada en una cepa colombiana de *K. pneumoniae*. La evidencia “*in silico*” sugirió que este transposón parece estar movilizándose entre diferentes estructuras plasmídicas, pero sin evidencia experimental de su capacidad de movilización

(transposición activa). Para esto, en este trabajo se realizó el diseño del ensayo de conjugación, para analizar de forma controlada la funcionalidad de este transposón.

En el presente estudio, el aislamiento de *K. pneumoniae* no transfirió sus determinantes de resistencia a carbapenémicos por conjugación. Lo que sugiere que la frecuencia de conjugación de 33Kpn12-1 (IncN) es baja. En otros estudios realizado por Tabrizi y colaboradores (2018) presentan frecuencias de conjugación bajas con una media de 4.5×10^{-10} , entre *K. pneumoniae* (IncN) y *E. coli* J53. De igual manera para experimentos realizados con otras especies donadoras como *Salmonella sp.* con plásmido tipo IncN se presentan frecuencias de conjugación que oscilan entre 10^{-9} y 10^{-13} (Dorr et al, 2022)

A pesar de no identificar cepas transconjugantes en los ensayos donde *K. pneumoniae* 33Kpn12 fue donadora, se observó un evento de conjugación por parte de *E. coli* K12. Sugiriendo que los ensayos de conjugación tiene mayor probabilidad al ser realizados con cepas de referencia. Lo que coincide con Hasman y colaboradores (2005), afirmando que los ensayos de conjugaciones para transferir la resistencia antimicrobiana generalmente se realizan “in vitro” con cepas de referencia (*E. coli* K12) o cepas adaptadas para la conjugación. Por otro lado Cáceres y colaboradores (2021), presentaron mejores resultados entre la conjugación de *E. coli* K12 hacia *K. pneumoniae* con una frecuencia de conjugación de 10^{-4} , que a diferencia de la inversa del ensayo con una frecuencia de conjugación de 10^{-7} . Por lo que el estudio de la movilización de EGM como los plásmidos en aislamientos clínicos de interés son un reto mayor para la investigación. Adicionalmente en la estrategia, en el que se dio este evento de conjugación presenta otro factor a favor debido que se realizó en medio sólido con el uso de filtros, lo que beneficia al evento de conjugación por el contacto directo y estático entre las bacterias de interés, a diferencia de

un medio líquido donde están en constante movimiento y el evento es más complejo de ejecutarse (Smith, 1980).

Finalmente de las poblaciones bacterianas de J53 se observó que solo una albergaban la región del Tn6454 con *bla*_{KPC-2}, lo que sugiere que la movilización de este a través del plásmido p333Kpn12-1 es baja. Sin embargo se desconocen sus frecuencias de transposición “*in vitro*”. Teniendo en cuenta que este hace parte de la familia Tn3, uno de los transposones más representativos de esta familia que moviliza *bla*_{KPC} actualmente presenta una frecuencia de transposición es alrededor de 10^{-3} a 10^{-4} /plásmido receptor.

Estos resultados sugieren que la diseminación del gen *bla*_{KPC-2} es cada vez más frecuente, donde los mecanismos de movilización juegan un papel esencial, por tanto, su análisis y estudio de su funcionamiento son de gran relevancia para el monitoreo de esta mayor diseminación. El entendimiento de los diferentes mecanismos de movilización de DNA y su impacto en la evolución bacteriana permitirá diseñar nuevas y más eficientes estrategias para la prevención y el tratamiento infecciones producidas por bacterias.

9 CONCLUSIONES

El *Tn6454* parece se activó y tener la capacidad de movilizarse de manera independiente entre diferentes estructuras o moléculas de DNA, probablemente a través de la actividad de su transposasa. La transposición de *Tn6454* favorece la movilización del gen *bla*_{KPC-2}, aumentando su diseminación entre diferentes cepas de *K. pneumoniae* y a otras especies bacterianas.

10 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La limitación más importante fue la obtención de los resultados en una población bacteriana *E. coli*, debido a limitaciones en el tiempo, no se logró aislar una colonia que cumpliera con las condiciones de transposición. Adicionalmente, se asume que la transposición se dio hacia el plásmido 33Kpn12-1, sin embargo, existe la posibilidad de que este se haya movilizado al ADN cromosomal de la cepa J53, por lo cual se recomienda una secuenciación completa de la cepa para la confirmación del evento de transposición.

BIBLIOGRAFÍA

Abril, D., Vergara, E., Palacios, D., Leal, A. L., Marquez-Ortiz, R. A., Madroñero, J., ... & Escobar-Perez, J. (2021). Within patient genetic diversity of blaKPC harboring *Klebsiella pneumoniae* in a Colombian hospital and identification of a new NTEKPC platform. *Scientific Reports*, 11(1), 1-16. Ashurst, JV y Dawson, A. (2018). Neumonía por *Klebsiella*.

Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 33(10), 692-699.

Barrantes Jiménez, K., Chacón Jiménez, L., & Arias Andrés, M. (2022). El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible. *Población y Salud en Mesoamérica*, 19(2), 305-329.

Benguigui Y. Resistencia antimicrobiana en las Américas: magnitud del problema y su contención. Washington. Organización Panamericana de la Salud, 141.

BENNET.P.M (2004) GENOME PLASTICITY. IN GENOMICS PROTEOMICS.

Bernabé Balas, C. (2019). Identificación y caracterización molecular de mecanismos de adaptación plasmídica a nuevas familias bacterianas.

Bulik, C. C., Fauntleroy, K. A., Jenkins, S. G., Abuali, M., LaBombardi, V. J., Nicolau, D. P., & Kuti, J. L. (2010). Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for

carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. *Journal of clinical microbiology*, 48(7), 2402-2406.

Bulman, Z. P., Krapp, F., Pincus, N. B., Wenzler, E., Murphy, K. R., Qi, C., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2021). Genomic Features Associated with the Degree of Phenotypic Resistance to Carbapenems in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *MSystems*. <https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00194-21>

Cáceres, R. R., Cárdenas, A. T., Villa, G. S., Romero, O. C., & Urbina, M. C. (2021). Prevalencia de β -lactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* identificados en una institución de salud en Barranquilla. *Biociencias*, 16(1), 46-50.

Calles, D. M. E., Gamboa, M. F. R., & Álvarez, E. A. V. (2022). Resistencia a antibióticos betalactámicos: situación actual y nuevas estrategias. *RD-ICUAP*, 8(22), 13-27.

Campo Gutiérrez, I. D. (2016). Estudio de la red de regulación global de R388.

CDC. (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. . <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>

Chen, S., Larsson, M., Robinson, R. C., & Chen, S. L. (2017). Direct and convenient measurement of plasmid stability in lab and clinical isolates of *E. coli*. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05219-x>

Cuzon, G., Naas, T., & Nordmann, P. (2011). Functional characterization of Tn 4401, a Tn 3-based transposon involved in bla KPC gene mobilization. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11), 5370-5373.

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

Forero Hurtado, D. P. (2021). Análisis de los mecanismos asociados a la estabilización y persistencia del plásmido tipo ColRNAI_blaKPC-2 del aislamiento clínico de *Klebsiella pneumoniae* 33Kpn12.

Instituto Nacional de Salud. (2021). Boletín Epidemiológico. <https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/BoletinEpidemiologico/Forms/AllItems.aspx>

Lema, F., & Vanessa, A. (2022). Descripción molecular de los genes que confieren resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter baumannii* (Bachelor's thesis, Quito: UCE).

Lima, G. J. D., Scavuzzi, A. M. L., Beltrão, E. M. B., Firmo, E. F., Oliveira, É. M. D., Oliveira, S. R. D., ... & Lopes, A. C. D. S. (2020). Identification of plasmid IncQ1 and NTEKPC-IIId harboring blaKPC-2 in isolates from *Klebsiella pneumoniae* infections in patients from Recife-PE, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53.

Lirola Andreu, L., Ávila Jiménez, Á. F., Fernández Mariscal, M. A., Reinoso Espín, Á., & Martínez Martínez, S. (2022). La resistencia bacteriana. Generalidades, carbapenemasas y actualidad: una revisión narrativa.

Liu, X., Chan, E. W. C., & Chen, S. (2021). Transmission and stable inheritance of carbapenemase gene (blaKPC-2 or blaNDM-1)-encoding and mcr-1-encoding plasmids in clinical Enterobacteriaceae strains. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 26, 255-261.

López, J. A., & Echeverri, L. M. (2010). *K. pneumoniae*: ¿la nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932010000200007

Melgarejo, N., Martinez, M., Franco, R., & Falcón, M. (2013). Enterobacterias resistentes a Carbapenemes por producción de KPC, aisladas en hospitales de Asunción y Departamento Central. *Revista Salud Pública del Paraguay*, 3(1), 30-35.

Montúfar-Andrade, F. E., Mesa-Navas, M., Aguilar-Londoño, C., Saldarriaga-Acevedo, C., Quiroga-Echeverr, A., Builes-Montaño, C. E., ... & Hernández, C. (2016). Experiencia clínica con infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa, en una institución de enseñanza universitaria en Medellín, Colombia. *Infectio*, 20(1), 17-24.

Monge, K. M. M. (2013). Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista médica de Costa Rica y centroamérica*, 70(608), 599-605.

Moreno, C., González, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 69(2), 185-192.

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., ... & Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.

National Center for Biotechnology Information. (2021). Genome List - Genome - NCBI.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/overview/Klebsiella%20pneumoniae>

Orlek, A., Phan, H., Sheppard, A. E., Doumith, M., Ellington, M., Peto, T., Crook, D., Walker, A. S., Woodford, N., Anjum, M. F., & Stoesser, N. (2017). Ordering the mob: Insights into replicon and MOB typing schemes from analysis of a curated dataset of publicly available plasmids. *Plasmid*, 91, 42–52.
<https://doi.org/10.1016/J.PLASMID.2017.03.002>

Paciel, D., Seija, V., Prieto, J., Vignoli, R., Medina, J., & Savio, E. (2008). Enterobacterias productoras de KPC.

Paterson, D. L., Ko, W. C., von Gottberg, A., Mohapatra, S., Casellas, J. M., Goossens, H., Mulazimoglu, L., Trenholme, G., Klugman, K. P., Bonomo, R. A., Rice, L. B., Wagener, M. M., McCormack, J. G., & Yu, V. L. (2004). International Prospective Study of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Implications of Extended-Spectrum β -Lactamase Production in Nosocomial Infections. *Annals of Internal Medicine*, 140(1), 26–32.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-140-1-200401060-00008>

Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 31(4).

Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2008). Genetic support of extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 75-81.

Quintero Meza, E. V., & Varón Rodríguez, C. (2022). Caracterización de la colonización por *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos en pacientes provenientes de UCI.

Resistencia a los antibióticos. (2020, 31 julio). Recuperado 3 de octubre de 2022, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

Robledo, C., & Robledo, J. (2000). Panorama de la resistencia a los antibióticos en Colombia. Salvatierra R, Benguigui Y. Resistencia antimicrobiana en las Américas: magnitud del problema y su contención. Washington. Organización Panamericana de la Salud, 141.

Roy, P. H., & Partridge, S. R. (2017). Genetic mechanisms of transfer of drug resistance. In *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 61-76). Springer, Cham.

Ruiz-Castellanos, J., Márquez-Ortiz, R. A., Abril, D., Hurtado, D. F., Tijaro, G., Corredor-Rozo, Z., ... & Vanegas, N. (2022, June). In Silico Analysis and PCR Characterization of non-Tn 4401 Transposable Elements in *Pseudomonas aeruginosa*. In *Medical Sciences Forum* (Vol. 12, No. 1, p. 33). MDPI.

Samperio, S., Guzmán-Herrador, D. L., May-Cuz, R., Martín, M. C., Álvarez, M. A., & Llosa, M. (2021). Conjugative DNA Transfer From *E. coli* to Transformation-Resistant *Lactobacilli*. *Frontiers in microbiology*, 12, 606629.

Silva, J., Gatica, R., Aguilar, C., Becerra, Z., Garza-Ramos, U., Velázquez, M., ... & Echániz, G. (2001). Outbreak of infection with extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital. *Journal of clinical microbiology*, 39(9), 3193-3196.

Smith, M. D., & Guild, W. R. (1980). Improved method for conjugative transfer by filter mating of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, 144(1), 457-459.

Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(2), 116-129.

Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M., ... & González-Rocha, G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 476-484.

Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*, 40(4), 277.

Villalobos Rodríguez, A. P., Díaz Ortega, M. H., Barrero Garzón, L. I., Rivera Vargas, S. M., Henríquez Iguarán, D. E., Villegas Botero, M. V., ... & Leal Castro, A. L. (2011).

Tendencias de los fenotipos de resistencia bacteriana en hospitales públicos y privados de alta complejidad de Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 30, 627-633.

Villegas, V., Lolans, K., Correa, A., Jose Suarez, C., Lopez, J. A., Vallejo, M., & Quinn, J. P. (2006). First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(8), 2880-2882.

World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>

Wozniak, A., Figueroa, C., Moya-Flores, F., Guggiana, P., Castillo, C., Rivas, L., Munita, J. M., & García, P. C. (2021). A multispecies outbreak of carbapenem-resistant bacteria harboring the blaKPC gene in a nonclassical transposon element. *BMC Microbiology* 2021 21:1, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12866-021-02169-3>

Zhang, P., Wang, J., Shi, W., Wang, N., Jiang, Y., Chen, H., ... & Qu, T. (2022). In vivo acquisition of blaKPC-2 with low biological cost in blaAFM-1-harboring ST463 hypervirulent *Pseudomonas aeruginosa* from a patient with hematologic malignancy. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 31, 189-195.

ANEXOS

ANEXO 1. PCR de las agrupaciones poblacionales aisladas en el ensayo de conjugación con plásmido R388 **A.** Identificación de la presencia del plásmido R388 dentro de las agrupaciones poblacionales, resultantes del ensayo de conjugación en medio sólido **B.** Identificación de la presencia del plásmido p33Kpn12-1 dentro de las agrupaciones poblacionales, resultantes del ensayo de conjugación en medio semisólido. **C.** Identificación de la presencia del fragmento III de Tn6454 dentro de las agrupaciones poblacionales, resultantes del ensayo de conjugación en medio semisólido. **D.** Identificación de la presencia del fragmento II de Tn6454 dentro de las agrupaciones poblacionales, resultantes del ensayo de conjugación en medio sólido

