

ANÁLISIS GENÓMICO COMPARATIVO DE AISLAMIENTOS DE
Providencia rettgeri QUE TRANSPORTAN EL GEN *bla_{NDM}*
PROVENIENTES DE UN HOSPITAL DE MÉXICO.

LORENA CORTÉS VILLAMIL

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BOGOTÁ, COLOMBIA
2020

ANÁLISIS GENÓMICO COMPARATIVO DE AISLAMIENTOS DE *Providencia*
rettgeri QUE TRANSPORTAN EL GEN *bla*_{NDM} PROVENIENTES DE UN
HOSPITAL DE MÉXICO

LORENA CORTÈS VILLAMIL

TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO
DE: MAESTRO EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

DIRECTORA:
MSc. DEISY JULIETH ABRIL RIAÑO
CODIRECTORA:
PhD. LEIDY JOHANA MADROÑERO
CODIRECTOR:
PhD. RICAURTE ALEJANDRO MÁRQUEZ ORTIZ

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:
LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR BACTERIANA

UNIVERSIDAD EL BOSQUE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
BOGOTÁ, COLOMBIA
2020

Nota de Salvedad de responsabilidad institucional: " La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, sólo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia".

*"In the fields of observation chance favors
only the prepared mind." Louis Pasteur*

*A mis padres y a mi hermano, quienes
siempre han impulsado mi crecimiento
académico y personal. También a aquellos
que han estado en mi proceso de
formación, que con su ejemplo y exigencia
han sido inspiración para querer tener mi
mente más preparada.*

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB) de la Universidad El Bosque, con financiación de la Vicerrectoría de Investigaciones de dicha institución (proyecto PCI-2019-10891)

Agradezco profundamente a cada uno de los integrantes del Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana, especialmente a Deisy y a Johana por su entrega, su buena disposición a lo largo de todas las etapas de este proyecto y por sus enseñanzas. A Javier por la motivación, la confianza, el conocimiento que me brindó y por ser un buen líder. A Zayda, Carlos, María Paz y Santiago por sus aportes y por el apoyo, ya que estar en un buen equipo de trabajo hizo más agradable el aprendizaje, realmente fui muy feliz durante toda esta etapa. A Alejandro porque con él tuve mi primera experiencia en LGMB durante el pregrado y gracias a él, volví para mi proceso de maestría. LGMB por siempre!

Agradezco infinitamente a mis padres por su apoyo en todo sentido, por su buen ejemplo, su amor y paciencia, a mi hermano, por su apoyo, por exigirme siempre más y querer lo mejor para mi futuro.

RESUMEN

La amplia diseminación de la metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM) entre enterobacterias ha generado problemas en los sistemas de salud. Aunque se considera que el gen *bla*_{NDM} se originó en *Acinetobacter baumannii*, aún no es claro cómo fue su transferencia a *Enterobacterales* en donde ha tenido mayor impacto y a la que pertenece *Providencia rettgeri*. En el 2017, el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB), a partir de un aislamiento clínico de *P. rettgeri* de un hospital de México, reportó el plásmido p06-1619-NDM, una variante del plásmido pNDM-BJ01-like, propio de *Acinetobacter spp.*, e interesantemente, dicho plásmido presentó mayor estabilidad en *P. rettgeri*, sugiriendo que esta enterobacteria podría tener un papel clave en la diseminación del gen *bla*_{NDM}. Por lo tanto, en este estudio, con el fin de entender el papel de *P. rettgeri* en la diseminación y movilización del gen *bla*_{NDM} desde *Acinetobacter* a las distintas especies de enterobacterias, fueron analizados 19 aislamientos clínicos de *P. rettgeri*, provenientes de un estudio de vigilancia realizado por el Instituto de Salud Pública de México en alianza con el LGMB. Usando oligonucleótidos específicos y la información de los pulsotipos de los aislamientos obtenidos por PFGE, se realizó la caracterización molecular y filogenética de dichos aislamientos, por lo que se pudo establecer la presencia de al menos siete grupos clonales con diferencias genéticas asociadas al transposón Tn 125. Con base en este resultado, se secuenció el genoma de seis de estos aislamientos usando las tecnologías de secuenciación NovaSeq y PacBio. Los resultados mostraron, que a pesar de que no existía ningún vínculo epidemiológico, los aislamientos secuenciados en este estudio presentaron relación filogenética, no solo con genomas de aislamientos mexicanos, sino también con genomas de países como China, Japón y Colombia. El análisis de las plataformas de movilización del gen *bla*_{NDM}, permitió establecer la secuencia de tres nuevos plásmidos que portan este gen de resistencia. Se encontró, que estos plásmidos presentan relación con otros plásmidos reportados en *P. rettgeri* y en otras enterobacterias. Adicionalmente, los análisis de genómica comparativa resultaron en tres importantes hallazgos: I) La determinación de una nueva secuencia de inserción (*ISPrre10*) funcional, que además se identifica como una nueva plataforma de movilización del gen *bla*_{NDM} por un mecanismo de transposición de tipo círculo rodante. II) La identificación de la IS6368 como una posible plataforma de movilización del gen *bla*_{NDM} mediante unidades translocativas. III) La movilización de estos dos elementos genéticos móviles a plásmidos reportados en otras enterobacterias que convergen en *P. rettgeri*. En conjunto, estos resultados, sumados a lo

reportado previamente, sugieren a *P. rettgeri* como un reservorio para la diseminación del gen *bla*_{NDM} mediante nuevas plataformas que promueven su movilización y dispersión a otras enterobacterias de mayor impacto clínico.

Palabras clave: *Providencia rettgeri*, *bla*_{NDM}, pNDM-BJ01-like, IS*Prre10*, IS6368, Tn125.

ABSTRACT

The widespread of the New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) in enterobacteria has brought problems to the health system. Although it is commonly accepted that *bla*_{NDM} was originated in *Acinetobacter baumannii*, how this gene was transferred to the *Enterobacterales*, where it has had greater impact, remains unclear. In 2017, the Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB), identified the plasmid p06-1619-NDM in a clinical strain of *Providencia rettgeri* obtained from a mexican hospital. The plasmid p06-1619-NDM is highly similar to the *Acinetobacter spp.* pNDM-BJ01-like plasmids. It is stable in *P. rettgeri* and it constitutes the second report of a pNDM-BJ01-like plasmid in the *Enterobacterales*. This finding suggests that *P. rettgeri* could play an important role in the *bla*_{NDM} gene dissemination from *Acinetobacter* to different species of *Enterobacterales*. Therefore, in order to understand the role of *P. rettgeri* in *bla*_{NDM} gene dissemination and its mobilization from *Acinetobacter* to the *Enterobacterales*, in this work were analyzed 19 clinical isolates of *P. rettgeri* harboring the *bla*_{NDM} gene coming from a surveillance study carried out by the Instituto de Salud Pública de México in alliance with the LGMB. Using specific oligonucleotides and the information of each strain's pulsotype obtained by PFGE, a molecular and phylogenetic characterization of these isolates was performed. This analysis resulted in the identification of at least seven clonal groups with genetic differences associated with the Tn125 transposon. Using the above result, six isolates of *P. rettgeri* were selected to be sequenced using the NovaSeq and PacBio sequencing technologies. The sequencing results showed that, in spite of no epidemiological link among the sequenced isolates, these showed a phylogenetic relationship, not only with genomes from mexican isolates, but also with genomes from countries such as China, Japan and Colombia. The analysis of *bla*_{NDM} mobilization platforms led to the finding of three new plasmids harboring this resistance gene. These plasmids showed association with other plasmids previously reported in *P. rettgeri* and in other *Enterobacterales*. Additionally, comparative genomic analysis resulted in three important findings: I) It was determined a new functional insertion sequence (*ISPrre10*), associated to the *bla*_{NDM} mobilization by means of a rolling-circle transposition mechanism. II) Identification of IS6368 as a key mobilization platform in *P. rettgeri* by means of intermediary translocatable units. III) Mobilization of these two elements toward plasmids previously reported in other enterobacteria and converging in *P. rettgeri*. In summary, these results, in addition to the previously reported information, suggest that *P. rettgeri* plays an important

role as reservoir to the *bla*_{NDM} dissemination by means of new platforms that boost its mobilization and spread to other *Enterobacterales* with greater clinical impact.

Key words: *Providencia rettgeri*, *bla*_{NDM}, pNDM-BJ01-like, IS*Prre10*, IS6368, Tn125.

TABLA DE CONTENIDO

1 INTRODUCCIÓN.....	17
2 MARCO TEORICO	20
2.1 Generalidades del modelo de estudio: <i>Providencia rettgeri</i>	20
2.2 Resistencia adquirida a los β -lactámicos en <i>P. rettgeri</i>	20
2.3 <i>Providencia rettgeri</i> portadora del gen <i>bla_{NDM}</i>	23
2.4 Elementos genéticos móviles que participan en la diseminación de <i>bla_{NDM}</i>	24
2.4.1 Secuencias de inserción y transposones	24
2.4.2 Plásmidos	26
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo principal.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4 METODOLOGIA	30
4.1 Tipo de estudio y selección de aislamientos bacterianos.....	30
4.2 Extracción de ADN bacteriano para caracterización molecular.....	31
4.3 Confirmación molecular del género, especie y el gen <i>bla_{NDM}</i>	31
4.4 Determinación de la variabilidad plasmídica de los aislamientos de <i>Providencia rettgeri</i> que transportan el gen <i>bla_{NDM}</i>	32
4.5 Establecimiento de la secuencia del genoma de los principales clones de <i>Providencia rettgeri</i> que transportan el gen <i>bla_{NDM}</i> , en la población de estudio y comparación con los genomas reportados a nivel mundial	34
4.5.1 Secuenciación y ensamblaje de los genomas	34
4.5.2 Relación filogenética de los aislamientos	36
4.6 Análisis de las diferencias en las plataformas de movilización de <i>bla_{NDM}</i> de los aislamientos de <i>Providencia rettgeri</i> del hospital de México con respecto a aislamientos previamente reportados.	37
5 RESULTADOS	38

5.1 Co-circulación de diferentes clones de <i>Providencia rettgeri</i> portadores del gen <i>bla_{NDM}</i> en un hospital de México.....	38
5.2 Los principales clones de <i>Providencia rettgeri</i> que portan el gen <i>bla_{NDM}</i> , en la población de estudio presentan plásmidos diferentes portando el gen <i>bla_{NDM}</i>	41
5.3 El gen <i>bla_{NDM-1}</i> es transportado en diferentes estructuras plasmídicas en los aislamientos de <i>Providencia rettgeri</i> del hospital de México.	47
5.4 El gen <i>bla_{NDM-1}</i> es movilizado por las secuencias de inserción <i>ISPrre10</i> e <i>IS6368</i> en <i>Providencia rettgeri</i>	56
5.5 Plataformas de movilización del gen <i>bla_{NDM}</i> en aislamientos de <i>P. rettgeri</i> de un hospital de México.....	61
6 DISCUSIÓN.....	66
7 CONCLUSIONES	71
8 RECOMENDACIONES	72
9 BIBLIOGRAFIA.....	73
10 ANEXOS.....	80
10.1 Anexo 1. Caracterización molecular de los aislamientos de <i>P. rettgeri</i>	80
10.2 Anexo 2. Comparación genómica de los aislamientos de <i>P. rettgeri</i> de este estudio con el plásmido p06-1619-NDM	83
10.3 Anexo 3. Presencia de extremos repetidos, sugestivos de estructuras circulares completas.....	85

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la caracterización molecular por PCR de los aislamientos del estudio.....	33
Tabla 2. Ciclos de amplificación de PCR para la caracterización molecular de los aislamientos.....	33
Tabla 3. Estadísticas generales para los ensamblajes obtenidos en este estudio.....	43
Tabla 4. Descripción general de los genomas obtenidos y su resistoma.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de los mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en bacterias Gram negativas.....	21
Figura 2. Mecanismo de acción de NDM-1.	22
Figura 3. Proceso de transposición no replicativo.	25
Figura 4. Representación del Tn 125.	26
Figura 5. Orden cronológico de recolección de los aislamientos de <i>P. rettgeri</i> que hacen parte de este estudio.	30
Figura 6. Esquema metodológico general.....	31
Figura 7. Regiones de reconocimiento de los oligonucleótidos empleados en PCRs independientes de las reacciones 1 a 5 descritas en la tabla 1	32
Figura 8. Relación genética de los aislamientos respecto a la cepa 06-1619.....	40
Figura 9. Relación genética basado en los SNP's del "core-genome" de <i>Providencia rettgeri</i>	46
Figura 10. Descripción general de los plásmidos <i>bla</i> _{NDM-1} positivos de los tres aislamientos completamente secuenciados de <i>P. rettgeri</i> , comparados con la secuencia del plásmido p06-1619-NDM.	48
Figura 11. Comparación pareada de los plásmidos p06-1619-NDM, p12105-NDM y pRB151-NDM identificados en <i>P. rettgeri</i>	51
Figura 12. Comparación pareada de los plásmidos p06-1619-NDM, p12100-NDM, p06-1619-NDM-1 y pPrY2001-NDM de <i>P. rettgeri</i>	53
Figura 13. Comparación pareada de los plásmidos p06-1619-NDM, p3296-NDM, encontrados en <i>P. rettgeri</i> y el plásmido Rts1 de <i>Proteus vulgaris</i>	55
Figura 14. Estructura genética de <i>ISPrre10 A</i>	58
Figura 15. Estructura y secuencia de las regiones oriIS y terIS	59
Figura 16. Alineamiento de transposasas IS91-like. La figura muestra las secuencias de aminoácidos de 8 transposasas IS91-like únicamente.....	60
Figura 17. Movilización del gen <i>bla</i> _{NDM} por medio de la transposición de <i>ISPrre10</i>	62
Figura 18. Modelo de movilización del gen <i>bla</i> _{NDM} propuesto para el plásmido p3296-NDM.	63
Figura 19. Modelo de movilización del gen <i>bla</i> _{NDM} propuesto para el plásmido p12100-NDM.	64

Figura 20. Modelo propuesto de movilización del gen <i>bla</i> _{NDM} entre los plásmidos encontrado en este estudio y los antecedentes propuestos por Márquez y colaboradores en el 2017, partiendo del plásmido pNDMBJ01..	65
Figura 21. Modelo de diseminación del gen <i>bla</i> _{NDM} con <i>P. rettgeri</i> jugando un papel importante en la diseminación..	69

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
ADN	Ácido desoxirribonucleico
<i>bla</i>	β -lactamasa
CAZ	Ceftazidima
CRE	Enterobacterias resistentes a carbapenémicos
IMP	β -lactamasa con capacidad de hidrolizar imipenem
IS	Secuencia de inserción
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
OPS	Organización Panamericana de la Salud
NDM	Metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi
OXA	β -lactamasa con capacidad de hidrolizar oxacilina
pb	Pares de bases
PBP	Proteínas de unión a penicilina
TA	Toxina-Antitoxina
Tn	Transposón
TU	Unidad translocativa
TSD	Duplicación del Sitio Blanco
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PFGE	Electroforesis en Gel de Campos Pulsados

1 INTRODUCCIÓN

Las infecciones por bacterias que presentan resistencia a antibióticos son un problema creciente a nivel mundial, cuyo impacto en el ámbito hospitalario se ve reflejado en aumento de morbilidad, mortalidad y costos en el sistema de salud (1). Uno de los microorganismos que ha llamado la atención en esta problemática, son las enterobacterias, debido a la alta frecuencia de casos de infecciones con resistentes a carbapenémicos, antibióticos β -lactámicos de última línea terapéutica. Adicionalmente un estudio hecho entre 2009 y 2013, reveló que las infecciones por enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CRE) fueron asociadas con un riesgo cuatro veces mayor de que los pacientes reciban un tratamiento empírico inapropiado, y específicamente al analizar pacientes con enfermedad crónica y enfermedad aguda, los pacientes con CRE son tres veces más propensos a recibir un tratamiento empírico inapropiado (46.5% frente a 11.8%, $P < 0.001$), lo que a su vez aumenta la mortalidad, la estancia hospitalaria y los costos en los sistemas de salud (2). En Colombia, entre 2006 y 2010, el costo total promedio de la hospitalización de pacientes con infección por bacterias resistentes a carbapenémicos fue significativamente mayor al de los pacientes con infecciones susceptibles a estos antibióticos (costo ajustado; US \$ 11.359 versus US \$ 7.049), debido a permanencia en UCI más prolongadas y el aumento en los costos de los medicamentos antimicrobianos. (3, 4).

Debido a esta problemática, la OMS desde el año 2015 incluyó el Plan de Acción Global (GAP) sobre resistencia a los antimicrobianos, el cual tiene entre sus objetivos fortalecer el conocimiento a través de la vigilancia y la investigación con el fin de comprender y combatir el problema de la resistencia a los antimicrobianos (5). La participación de estas bacterias en la problemática de resistencia ha sido tal, que en el último reporte del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos, se estimó que en el 2017 los *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos, ha sido responsable de 13.100 casos de hospitalización de pacientes y 1.100 muertes al año (6). Esta familia de bacterias se ha vuelto resistente a casi todos los antibióticos disponibles, siendo una amenaza para la salud pública que requiere acción urgente (6). Es así que en 2017 la OMS definió a las CRE dentro de los patógenos de prioridad crítica que requieren la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos, ya que los actuales no proveen soluciones ante muchas infecciones (7). Finalmente se ha estimado que para 2050 al menos 10 millones de personas podrían morir por infecciones debido a la resistencia a los antimicrobianos (RAM) (8).

La resistencia a los antibióticos carbapenémicos en enterobacterias ha tenido una amplia propagación a nivel mundial, lo que puede deberse a la movilidad de genes de resistencia en diferentes especies, asociada a elementos genéticos móviles (EGM), como los plásmidos. Uno de los genes que ha adquirido mayor importancia es el gen *bla*_{NDM}, ya que confiere resistencia a casi todos los antibióticos de última línea, y a pesar de ser el de aparición más reciente, ha tenido rápida y amplia diseminación (9). Fue descrito por primera vez en *Klebsiella pneumoniae* y posteriormente fue identificado en diferentes especies de *Acinetobacter spp.* incluyendo *A. baumannii* y actualmente presenta alta dispersión entre *Enterobacterales* (10-12). A pesar de que no es clara la movilización del gen *bla*_{NDM} de *A. baumannii* a enterobacterias, el impacto clínico que tienen estas últimas, conduce a que haya una necesidad por conocer cómo se ha dado la diseminación de los mecanismos de resistencia en estos organismos (13). Como ejemplo de esta situación el Instituto Nacional de Salud de Colombia reportó un aumento en los casos de infecciones con aislamientos de *Providencia rettgeri* resistentes a carbapenémicos entre los años 2012 y 2014 (14). *P. rettgeri*, es una enterobacteria patógena oportunista capaz de generar infecciones especialmente del tracto urinario. A pesar de ser poco frecuente entre infecciones hospitalarias, este tipo de casos llama la atención ya que son más difíciles en el manejo de su tratamiento, por lo que es importante conocer más acerca de la diseminación de la resistencia en esta bacteria (15, 16). Adicionalmente en un estudio del Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana publicado en el 2017 por Márquez y colaboradores (17), se planteó que *P. rettgeri* puede estar actuando de manera importante en la diseminación del gen *bla*_{NDM}, pues se ha reportado que en esta convergen plásmidos de *A. baumannii* y de otras enterobacterias, con estructuras que sugieren que la evolución de los plásmidos NDM-positivos se da probablemente por eventos de transposición o co-integración entre plásmidos provenientes de bacterias como *P. rettgeri* (17). En este estudio, fue reportado un aislamiento de *P. rettgeri* de un hospital de México, en el que se encontró un plásmido pNDM-BJ01-like (18). Esta familia de plásmidos es propia de *Acinetobacter spp.* y tiene inusual circulación en enterobacterias, siendo este el segundo reporte en esta familia (17, 19), lo que sugiere que, *P. rettgeri* puede tener un papel importante en la diseminación de *bla*_{NDM}. Dada la importancia que tiene el hallazgo del plásmido pNDM-BJ01-like en *P. rettgeri*, surge el interés por estudiar los aislamientos de esta especie, provenientes de la misma institución mexicana, que permitan identificar los posibles cambios en la circulación de las plataformas de movilización del gen *bla*_{NDM} para poder entender el verdadero papel de esta enterobacteria en la movilización de dicho gen de resistencia.

Por esta razón se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Existen cambios en el genoma de los aislamientos de *Providencia rettgeri* que albergan el gen *bla_{NDM}*, provenientes de un hospital de México, y diferencias en sus plataformas genéticas de movilización?

Con el fin de resolver esa pregunta se realizó el análisis genómico comparativo de 19 aislamientos de *P. rettgeri* que portaban el gen *bla_{NDM}*, identificados durante los años 2012 a 2015 en la institución mexicana. Inicialmente se determinó en ellos la variabilidad plasmídica asociada a los plásmidos pBJ01-like, mediante la identificación molecular de regiones del transposón Tn125 (en el que se ubica el gen *bla_{NDM}*), la inserción de la IS6368 en el Δ Tn125 y la presencia de algunas regiones del transposón Tn6368 descrito por primera vez en el plásmido p06-1619-NDM. Estos resultados fueron asociados con la relación genética de los aislamientos, obtenida previamente por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) en México, lo que permitió seleccionar para secuenciación genómica mediante tecnologías de segunda y tercera generación a los principales clones que circularon en la institución con diferencias en las regiones de las plataformas de movilización analizadas. Estos genomas fueron comparados con los genomas de *P. rettgeri* reportados a nivel mundial mediante un análisis filogenético del genoma conservado “*genoma core*”. Finalmente se realizó un análisis “*in silico*” de las plataformas de movilización de *bla_{NDM}* de los aislamientos de *Providencia rettgeri* del hospital de México con respecto a aislamientos previamente reportados. Hasta marzo de 2020, sólo se habían reportado ocho genomas completos y doce plásmidos (siete son NDM-positivos), por lo que el análisis genómico comparativo de estos aislamientos mexicanos de *Providencia rettgeri* que portan el gen *bla_{NDM}*, aporta a la comprensión de los mecanismos por los cuales esta especie podría estar favoreciendo la diseminación de este gen de resistencia.

2 MARCO TEORICO

2.1 Generalidades del modelo de estudio: *Providencia rettgeri*

Providencia rettgeri es un bacilo Gram negativo no fermentador de lactosa, que pertenece los *Enterobacterales* de la familia *Morganellaceae* y a la tribu *Proteeae*. Esta bacteria puede ser encontrada ubicua en el ambiente y como parte de la microbiota del ser humano (20). Puede causar neumonía, meningitis, endocarditis, infecciones en heridas y del torrente sanguíneo, pero principalmente infecciones del tracto urinario, en las que tiene impacto significativo en la morbilidad, mortalidad y la prolongación del tratamiento de los pacientes (21-24). Se ha sugerido además la formación de biopelícula de esta especie en la superficie de los catéteres en vías urinarias y máquinas de diálisis, lo que promueve las condiciones que conllevan a infecciones potencialmente fatales, especialmente en casos de pacientes con el sistema inmune comprometido. (22, 25, 26).

La elección de la terapia antimicrobiana para las infecciones causadas por *P. rettgeri* usualmente incluye a β -lactámicos como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, monobactámicos y carbapenémicos; fosfomicinas; quinolonas y amikacina (20). Es importante resaltar que esta especie es resistente intrínsecamente a antibióticos como la ampicilina, las cefalosporinas de primera generación; los aminoglicósidos: gentamicina, tobramicina y netilmicina; las polimixinas como la colistina; las tetraciclinas y las glicilcilinas como la tigeciclina, siendo estos tres últimos grupos, opciones consideradas para el tratamiento de aislamientos multirresistentes en otras especies bacterianas (27). Aunque las infecciones hospitalarias por *P. rettgeri* son poco frecuentes, se han reportado aislamientos resistentes a múltiples antibióticos, incluyendo a los carbapenémicos (21, 28), β -lactámicos de mayor espectro, lo que sumado a la resistencia intrínseca de *P. rettgeri* representa mayor dificultad en la selección de tratamientos adecuados (29).

2. 2 Resistencia adquirida a los β -lactámicos en *P. rettgeri*

En la actualidad, los β -lactámicos son los antibióticos de uso más frecuente para el tratamiento de infecciones en múltiples especies, incluyendo *P. rettgeri* (30). Estos ejercen su acción como bactericidas mediante la interrupción de la formación de la pared celular

bacteriana, puesto que se unen covalentemente a las proteínas esenciales de unión a la penicilina (PBP), las cuales están involucradas en la unión de los peptidoglicanos que componen la pared celular (30). Este grupo de antibióticos está comprendido por las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos, los cuales conservan el anillo β -lactámico unido a diferentes radicales que amplían su espectro de acción (30).

Se han descrito diferentes mecanismos de resistencia a este grupo de antibióticos como la disminución de la expresión de porinas en la membrana, la expresión de bombas de eflujo, la modificación del sitio blanco de acción y de enzimas que hidrolizan los β -lactámicos, conocidas como β -lactamasas (31-33) (Figura 1). Estas enzimas, son capaces de hidrolizar el enlace amida del anillo β -lactámico, y se clasifican según Ambler en cuatro grupos (A, B, C y D) (34); teniendo en cuenta su sitio activo y el espectro de acción. Las serina β -lactamasas, entre las que están las enzimas clase A, C y D, tienen al aminoácido serina en su sitio activo, el cual emplean como nucleófilo de reacción para hidrolizar el anillo β -lactámico de penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos a través de un intermedio de acilenzima covalente y pueden inactivarse por los inhibidores de la β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) (9). Por otro lado están las enzimas de clase B, son metalo β -lactamasas, dependientes de zinc, que utilizan un nucleófilo de agua activado por metales para catalizar la reacción de hidrólisis de casi cualquier β -lactámico (a excepción de los monobactámicos) incluyendo a los inhibidores de β -lactamasas (10).

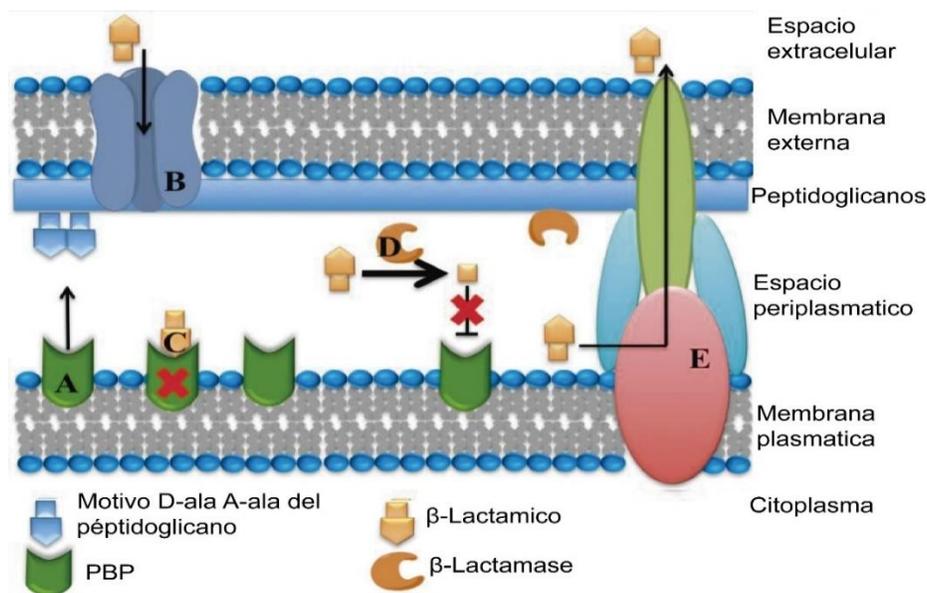


Figura 1. Esquema general de los mecanismos de resistencia a los antibióticos β -lactámicos en bacterias Gram negativas. A. Se observa las proteínas de unión a penicilina (PBPs) involucradas en la biosíntesis de la pared

celular, actuando en la unión de péptidos adyacentes a la porción terminal del motivo D-ala-D-ala. B. ingreso de β -lactámicos por medio de porinas hacia el espacio periplasmático C. Los β -lactámicos actúan inhibiendo la transpeptidación al ocupar el sitio requerido por el sustrato D. La β -lactamasas son exportadas al espacio periplasmático donde actúan catalizando la hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos. (E) Bombas de flujo, son otra forma en la que las bacterias pueden evadir la acción de los antibióticos, transportándolos al exterior. Modificado de Mojica et al. 2016 (33).

Las metalo- β -lactamasas (M β L) se agrupan en tres subclases B1, B2 y B3 de acuerdo con la identidad de los residuos esenciales del sitio activo y el perfil de sustrato. B1 puede actuar con uno o dos iones Zinc en su sitio activo, la subclase B2 requiere un ion Zinc y se inhibe con la presencia de otro ion zinc en el sitio activo y la subclase B3 requiere la presencia de dos iones Zinc (9). Siendo el más frecuente el grupo B1 del que resaltan la Imipenemasa Metalo- β -Lactamasa (IMP), la M β L codificada por el Integrón Verona (VIM) y la M β L de Nueva Delhi (NDM). En estas enzimas, los iones metálicos son esenciales para estabilizar los intermediarios de reacción que son claves en la hidrólisis de antibióticos β -lactámicos incluyendo a los de última línea como los carbapenémicos (Figura 2) (35).

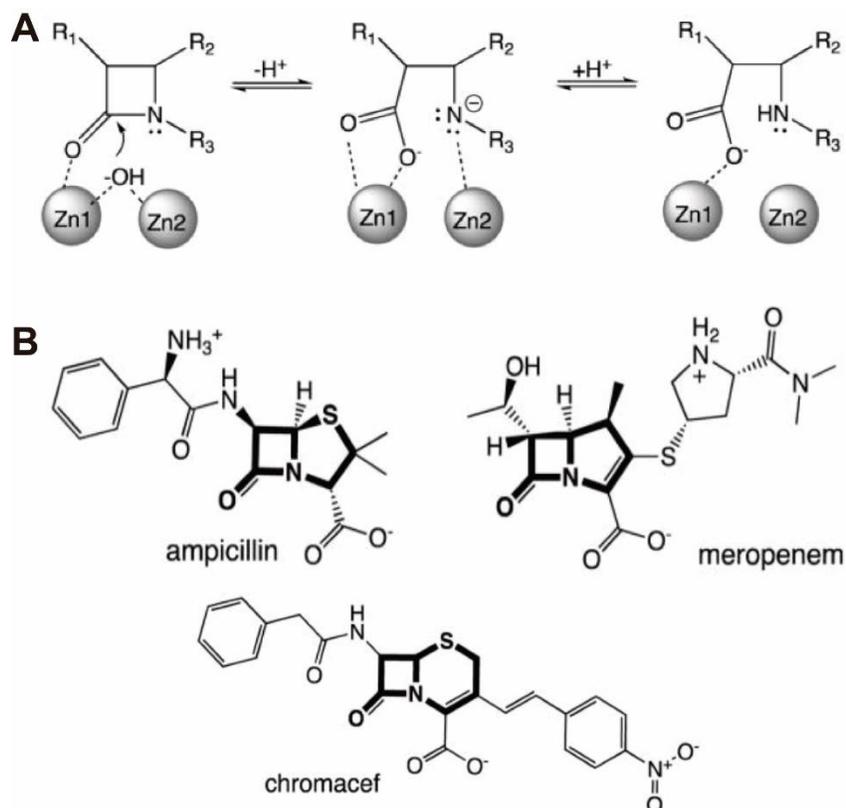


Figura 2. Mecanismo de acción de NDM-1. (A) Hidrólisis del anillo β -lactámico empleando los dos iones de zinc de NDM-1. (B) Estructuras de tres antibióticos β -lactámicos que pueden ser hidrolizados por la enzima NDM; ampicilina (penicilina), meropenem (carbapenémicos) y chromacef (cefalosporina), se resalta el anillo β -lactámico en cada una de las estructuras. Modificado de Stewart et al 2017 (36).

Aunque *P. rettgeri* es una bacteria poco frecuente, en algunos estudios han sido descritas las β -lactamasas de espectro extendido TEM, OXA, PER y las metalo- β -lactamasas IMP y NDM (28, 35, 37-40). Siendo esta última enzima, la carbapenemasa más frecuente en la especie (13).

2.3 *Providencia rettgeri* portadora del gen *bla*_{NDM}

El gen *bla*_{NDM} que codifica para la M β L de Nueva Delhi fue descrito en el año 2008 en *Klebsiella pneumoniae* y desde entonces ha tenido una amplia dispersión en todos los continentes, propagándose en diversas especies bacterianas, especialmente en un amplio número de enterobacterias, con mayor frecuencia *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* y también en bacterias no fermentadoras Gram negativas como *Pseudomonas spp.* y *Acinetobacter baumannii* (9, 10, 12, 18, 21, 41-43).

En 2011, por primera vez un aislamiento de *P. rettgeri* fue reportado con el gen *bla*_{NDM}, este aislamiento fue recuperado en India como resultado del estudio SMART (del inglés *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*) en el que analizaron 253 aislamientos de *Enterobacterales* con susceptibilidad reducida a ertapenem, provenientes de los cinco continentes. Desde entonces, se han publicado reportes de aislamientos de *P. rettgeri* con este gen recuperados incluso en el año 2008 (previo al primer reporte). A la fecha, se han reportado casos de *P. rettgeri* portando el gen *bla*_{NDM} en dieciocho países de diferentes continentes (India, Nepal, Indonesia, China, Corea, Pakistán, Israel, Sudáfrica, Turquía, Bulgaria, Australia, Canadá, Estados Unidos, Brasil, Ecuador, Argentina, México y Colombia), lo que se sugiere un aumento en la circulación de *bla*_{NDM} en la especie (10, 21, 44-46).

La diseminación del gen *bla*_{NDM} en *P. rettgeri* y en otras especies ha sido asociada usualmente con elementos genéticos móviles (EGM). Estos son secuencias de ADN que generalmente tienen capacidad de replicarse y movilizarse autónomamente en las células bacterianas, promoviendo la movilidad intracelular e intercelular del ADN (16). La presencia de este gen en EGM, le ha brindado una gran versatilidad y capacidad de diseminación entre diferentes especies, lo que ha llevado a que bacterias que tenían bajo impacto clínico como *P. rettgeri*, considerada como un microorganismo ambiental, actualmente esté

causando infecciones hospitalarias multirresistentes y la resistencia a los carbapenémicos esté siendo asociada con mayor frecuencia a la presencia del gen *bla_{NDM}* (10, 47).

2.4 Elementos genéticos móviles que participan en la diseminación de *bla_{NDM}*

Los EGM debido a la capacidad de movilización que tienen, han facilitado la transmisión de información genética entre bacterias de la misma especie y entre diferentes especies bacterianas, ya que estos a menudo incorporan en el genoma genes y operones de sus huéspedes anteriores (48). Existen diferentes EGM, entre los que se resaltan las secuencias de inserción, los transposones y los plásmidos, los cuales han sido involucrados en la transferencia de factores de virulencia y genes de resistencia como *bla_{NDM}* en múltiples especies (16).

2.4.1 Secuencias de inserción y transposones

Las secuencias de inserción (IS) y los transposones (Tn) son elementos genéticos móviles, relativamente pequeños conformados por fragmentos de ADN que tienen la capacidad de moverse a una nueva ubicación en la misma molécula de ADN dentro de una célula, gracias a la acción de enzimas llamadas transposasas (Tnp) y con frecuencia es posible encontrar varias copias de estos elementos en una sola molécula de ADN (16). Los transposones son de mayor tamaño que las secuencias de inserción, y en algunos casos cuentan con genes accesorios como las recombinasas y resolvasas que favorecen la movilización (49), cuentan con extremos en los cuales se encuentran secuencias de inserción, que son los EGM autónomos más sencillos y también los más abundantes, que presentan secuencias cortas repetidas, llamadas repetidos invertidos (IRs) (50). Los extremos de muchas IS pueden ser definidos como IR izquierdo (IR_L, por su sigla en inglés) e IR derecho (IR_R) de acuerdo con la dirección del gen *tnp* (de la transposasa). La trasposición de estos elementos puede darse de dos formas, la primera es conservativa, en la cual la transposasa hace un corte en la IS, sale de la zona de origen y al encontrar la secuencia objetivo, la transposasa hace un corte para que los extremos de la IS puedan insertarse en su nueva ubicación. La segunda forma de transposición es replicativa, en esta, la transposasa al encontrar la secuencia objetivo le hace un corte y en ese punto, le une un extremo de la IS, entonces la participación de una enzima resolvasa permite que la hebra donante se separe de la

receptora, mientras que por un proceso de recombinación se forma un co-integrado que permite que el ADN objetivo reconstruya la cadena con la secuencia insertada (16) (Figura 3). En la transposición replicativa quedan copias de la secuencia de la IS por la que se dio la movilización en la ubicación de origen y en la ubicación de destino, como resultado de la reparación de ADN que se da después de la escisión, generando secuencias cortas repetidas que oscilan entre 3 y 14 pb (la longitud depende del tipo de IS), llamados TSD (por su sigla en inglés *target site duplication*), sin embargo, algunas IS no parecen formar TSDs ni IRs (16).

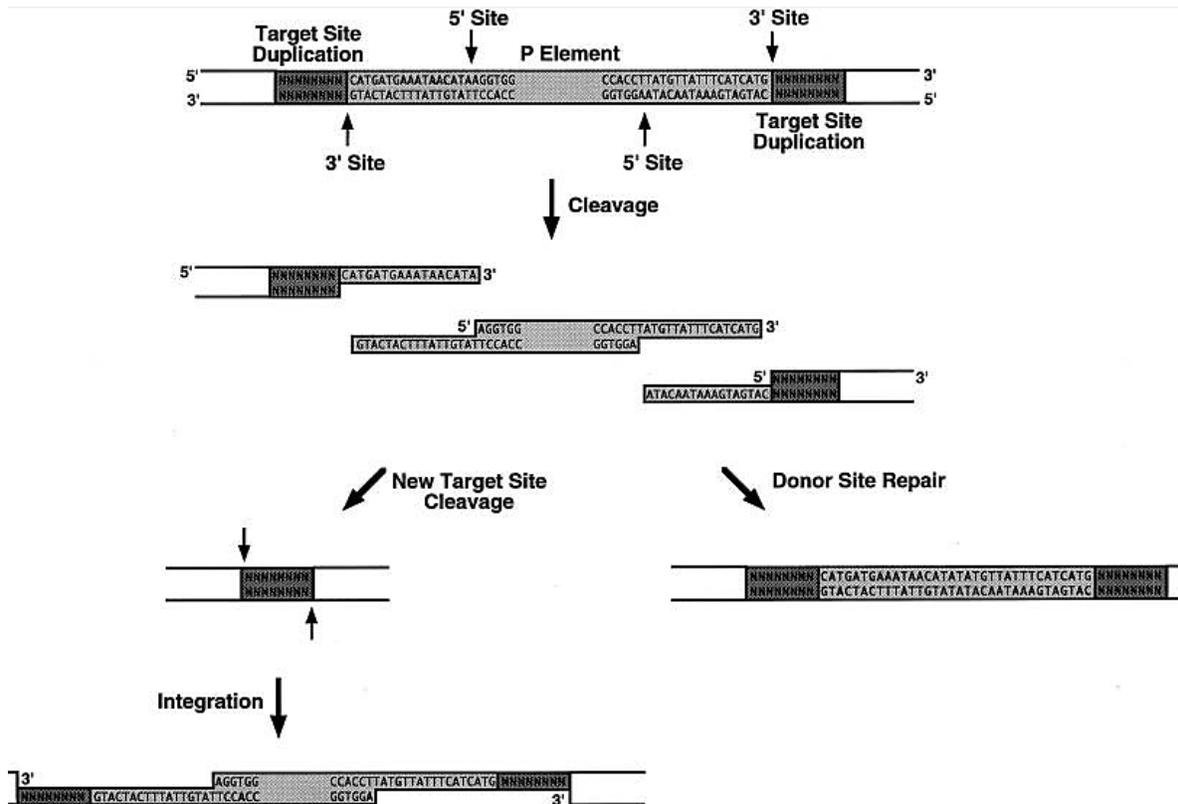


Figura 3. Proceso de transposición no replicativa. A. La transposasa del elemento P se une a secuencias dentro de ambos extremos del elemento P e inicia una ruptura de ADN bicatenario en cada extremo, como lo indican las flechas. La secuencia clivada se puede insertar en un nuevo sitio objetivo (izquierda). La reparación de espacios generará las duplicaciones características del sitio objetivo (TSD) (51)

Estos eventos son de gran importancia ya que con frecuencia las IS flanquean un gen de resistencia y son capaces de movilizarlo generando un transposón compuesto, tal como se ha descrito en la movilización del gen *bla_{NDM}*, con el Tn125 (11, 52). Inicialmente, se considera que *bla_{NDM}*, es producto de la fusión entre un gen de resistencia a aminoglicósidos (*aphA6*) y el gen de una metalo-β-lactamasa preexistente en *Acinetobacter* que

posteriormente se unió a la secuencia de inserción *ISAbal25* y dio origen finalmente, al gen *bla_{NDM}* (11). El gen *bla_{NDM-1}* se ha encontrado a su vez flanqueado por dos copias de la *ISAbal25*, generando un transposón conocido como Tn125 el cual actualmente se encuentra con frecuencia en enterobacterias y en plásmidos conjugativos, facilitando la dispersión de este gen (Figura 4) (11).

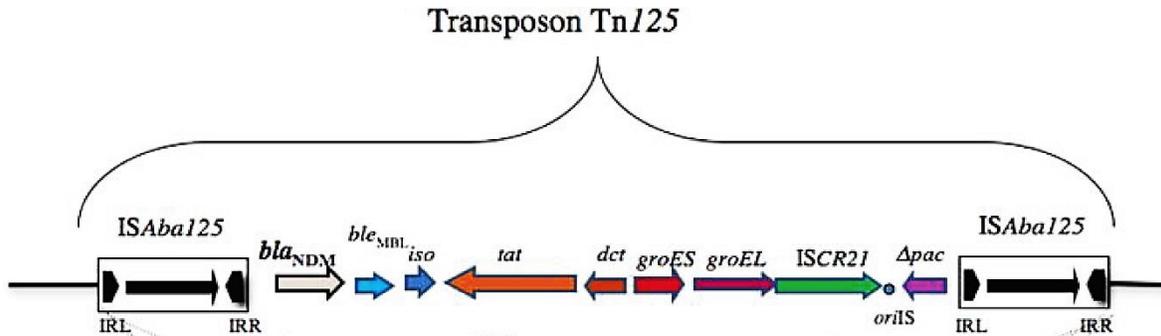


Figura 4. Representación del Tn125 figura tomada de (53). Las flechas representan los genes que se encuentran usualmente en este transposón, con las copias de *ISAbal25* en los extremos (53).

2.4.2 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas extracromosomales de ADN de doble cadena y estructura circular, con capacidad de autoreplicarse de manera independiente (54). Cuentan con mecanismos que les permiten separar sus copias para asegurarse de dejar al menos un plásmido en cada célula hija (capacidad de partición), pueden controlar el número de copias que generan para la transferencia conjugativa y a pesar de no ser portadores de genes esenciales para la supervivencia de la bacteria, usualmente transportan genes de virulencia y resistencia que le proveen ventajas a la bacteria hospedera (54).

Los plásmidos con capacidad de transferirse de una bacteria a otra, son llamados plásmidos conjugativos y juegan un papel importante en la transferencia horizontal de genes (THG) y en la propagación de la resistencia a antibióticos (55). Puesto que el conocimiento de su genética poblacional, rango de hospedadores y tasas de transferencia es de gran utilidad, se ha buscado agrupar los plásmidos para identificar características comunes en ellos. Dado que los plásmidos que pertenecen a un mismo grupo, generalmente no pueden cohabitar en la misma bacteria hospedadora, los conjuntos en los que se han clasificado, se han denominado grupos de incompatibilidad (Inc) (48). La incompatibilidad que hay entre

dos o más plásmidos del mismo grupo se ha asociado con el hecho de que al ser altamente similares pueden compartir el mismo origen de replicación y sistema de partición, lo que puede causar que no puedan mantenerse de manera estable en la misma célula y uno de ellos se pierda rápidamente, especialmente si alguno es de menor tamaño o tiene menor toxicidad (56, 57). A partir del concepto de incompatibilidad, se han agrupado diferentes plásmidos conocidos, lo que ha permitido identificar algunos grupos de plásmidos en los que se movilizan genes de resistencia que son de alto impacto clínico, como el caso del gen *bla*_{NDM}, el cual ha sido reportado generalmente en grupos de incompatibilidad F, A/C, L/M, H12, N y X3 (54, 58).

Aunque la mayoría de los estudios de *P. rettgeri* albergando el gen *bla*_{NDM} se han centrado en la descripción de los perfiles de susceptibilidad y la caracterización de carbapenemasas; algunos pocos han logrado describir a los plásmidos responsables de la adquisición de este mecanismo de resistencia (59). A la fecha han sido secuenciados siete plásmidos albergando el gen *bla*_{NDM} en *P. rettgeri*, el primero fue el pPrY2001, identificado en un aislamiento clínico de Canadá en 2010, el cual no perteneció a algún grupo de incompatibilidad conocido y presentaba la maquinaria de conjugación plasmídica Tra-Pre (60). Posteriormente, en 2017, el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana analizó la epidemiología genómica de plásmidos que codificaban NDM-1 en aislamientos clínicos de *P. rettgeri* de Colombia y México (recolectados entre los años 2012 y 2014), el cual permitió identificar la secuencia completa de tres plásmidos nuevos, p16Pre36 y pRB151 en aislamientos colombianos y p06-1619-NDM en un aislamiento mexicano. Dichos aislamientos a pesar de no presentar ninguna relación epidemiológica tenían en común la presencia de un plásmido NDM-positivo. Adicionalmente los aislamientos de México presentaron >99% de identidad nucleotídica sobre 64% a 76% de la secuencia completa de pPrY2001 lo que puede deberse a la presencia de un segundo plásmido como en el caso del aislamiento 06-1619 (17). El plásmido p16Pre36, proveniente de un aislamiento de Bogotá, tiene dos regiones que codifican para la transferencia conjugativa, una de estas ha sido encontrada únicamente en *P. rettgeri* (Tra-Pre) y la otra se encuentra en muchas enterobacterias (Tra1) (17). El plásmido pRB151-NDM proveniente de un aislamiento de Bucaramanga, tiene una estructura genética completamente novedosa, no relacionada a ninguna secuencia reportada previamente en la base de datos de nucleótidos del NCBI (17). En este último plásmido el gen de resistencia *bla*_{NDM-1} se encontró dentro de un Δ Tn 125 que tiene sus dos IS*Aba125* truncadas, codifica una maquinaria putativa para la

transferencia conjugativa del plásmido, para proteínas de los procesos de replicación y partición del plásmido, y un operón putativo para la producción de fimbrias. Finalmente, el plásmido p06-1619-NDM fue identificado en un aislamiento (06-1619) de México, el cual albergaba también al plásmido p06-1619-1, sin genes de resistencia y con la región de transferencia conjugativa Tra-Pre del pPrY2001 (17, 18). p06-1619-NDM tiene un tamaño de 54 kb y una identidad nucleotídica >99% sobre una cobertura del 74% de la secuencia de pNDM-BJ01, por lo que pertenece a la familia de plásmidos pNDM-BJ01-like, identificados con frecuencia en especies de *Acinetobacter*, presenta el Tn125 truncado después del gen *tat* por la inserción de dos copias de la secuencia de inserción IS6368, que se localizan formando un transposón clase I, con secuencias de inserción IS5 e IS26 y los sistemas toxina-antitoxina *parED* y *relEB* (18). Adicionalmente, se han publicado en la base de datos de nucleótidos del NCBI, tres plásmidos más de *P. rettgeri* con el gen *bla*_{NDM}, p2055-IMP (NZ_MH882484.1) y pNDM-QD51 (NZ_MH263652.1) de China; y un plásmido del aislamiento AR_0082 (NZ_CP029737.1) de origen desconocido. Estos plásmidos aún no cuentan con análisis de plataformas de movilización de este mecanismo de resistencia, lo que ha dificultado los análisis comparativos con otros estudios.

Aunque aún no es claro el mecanismo de transferencia y dispersión del gen *bla*_{NDM-1} desde *Acinetobacter* a otras especies de enterobacterias, el hallazgo en *P. rettgeri* de un plásmido pBJ01-like (p06-1619-NDM), usualmente encontrado en *Acinetobacter spp.*, llevo a plantear que posiblemente *P. rettgeri* ha estado involucrada en la transferencia de *bla*_{NDM} desde *Acinetobacter spp.* a *Enterobacterales* (17). Teniendo en cuenta que se tienen solamente dos reportes de este tipo de plásmidos en enterobacterias, el primero en *Enterobacter aerogenes* y el segundo el de *P. rettgeri*, el estudio de esta última especie en la transferencia del gen *bla*_{NDM} toma particular importancia para entender los posibles mecanismos de dispersión de este gen de alto impacto clínico (11, 17-19). Debido a este hallazgo, el hospital de México continuó la vigilancia de este tipo de aislamientos, hasta el año 2015, encontrando más aislamientos de *P. rettgeri* portadores del gen *bla*_{NDM}, de los cuales se desconocía la estructura genética de los elementos genéticos móviles que promovieron la movilización de este importante gen de resistencia y que hacen parte de este estudio.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Realizar el análisis genómico comparativo de aislamientos de *Providencia rettgeri* que transportan el gen *bla_{NDM}* identificados en un hospital de México.

3.2 Objetivos específicos

Determinar la variabilidad plasmídica de los aislamientos de *Providencia rettgeri* que transportan el gen *bla_{NDM}*.

Establecer la secuencia del genoma de los principales clones de *Providencia rettgeri* que transportan el gen *bla_{NDM}*, en la población de estudio y compararlos con los genomas reportados a nivel mundial.

Analizar las diferencias en las plataformas de movilización de *bla_{NDM}* de los aislamientos de *Providencia rettgeri* del hospital de México con respecto a aislamientos previamente reportados.

4 METODOLOGIA

4. 1 Tipo de estudio y selección de aislamientos bacterianos

Se realizó un estudio descriptivo y retrospectivo a partir de 20 aislamientos clínicos de *Providencia rettgeri*, recolectados durante los años 2012 a 2015 en un hospital mexicano (Figura 5), institución de la cual previamente fue recuperado el aislamiento de *P. rettgeri* 06-1619. Estos aislamientos fueron caracterizados como NDM positivos por el Instituto Nacional de Salud Pública de México y enviados al Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque en Colombia.

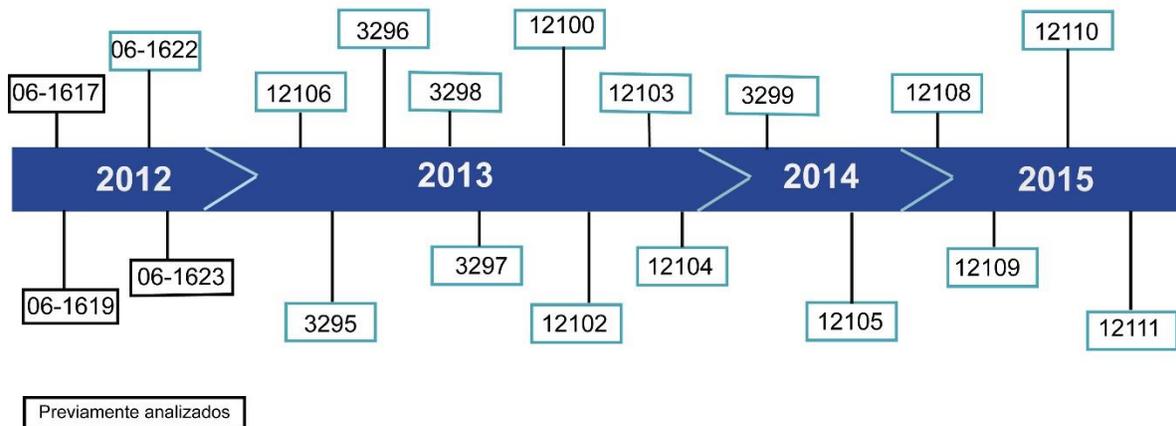


Figura 5. Orden cronológico de recolección de los aislamientos de *P. rettgeri* que hacen parte de este estudio.

Los aislamientos fueron cultivados en agar MacConkey e incubados a 37°C por 24 horas para confirmar su pureza y viabilidad. Posteriormente fueron criopreservados a -80°C en caldo Trypticase Soya con 15% de glicerol para los análisis moleculares y genómicos posteriores ilustrados en la Figura 6.

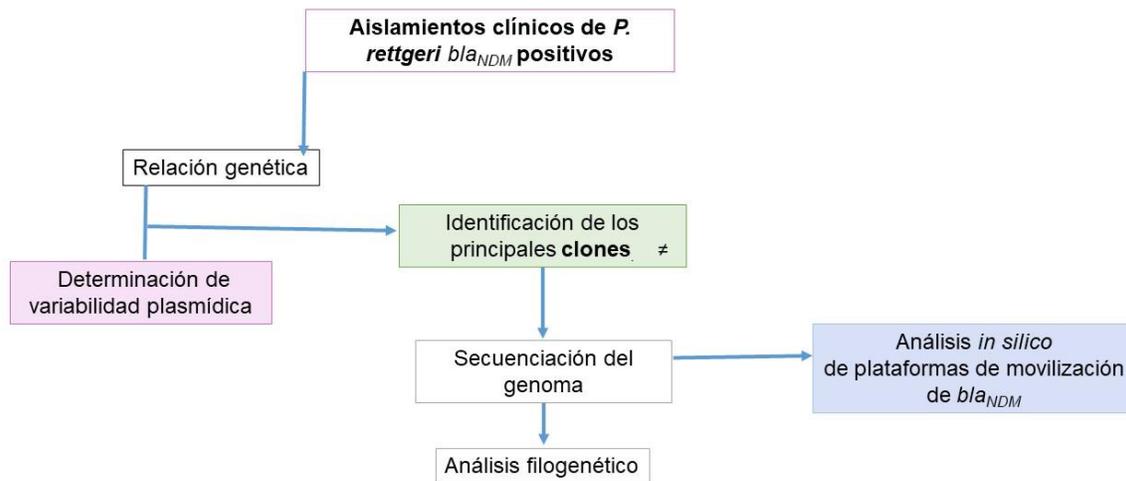


Figura 6. Esquema metodológico general. Se muestran a manera general las estrategias metodológicas que se manejaran para el análisis de los aislamientos del estudio.

4.2 Extracción de ADN bacteriano para caracterización molecular

La extracción de ADN se llevó a cabo a partir de 3 o 4 UFC obtenidas de un cultivo previo en agar MacConkey con un crecimiento de 24 horas a 37°C, a las que se les agregó 100 µL de buffer lisis (TRIS HCL 1M pH 8.0, EDTA 0.5M pH 8.0, sacarosa 7%, lisostafina 1µg/µL y SDS 1.25%) , se incubó a 37°C por 1 hora, luego se adicionó 200 µL de fenol cloroformo (1:1); se mezcló en vórtex y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo de 0.6 mL y se le adicionó 200 uL de Etanol frio al 95% para precipitar el DNA, el cual se incubó a -80°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos y se descartó el etanol. El ADN se dejó secar a temperatura ambiente por 1 hora y se resuspendió en agua destilada estéril. La cuantificación y la verificación de la calidad del ADN se hizo usando NanoPhotometer® NP80 marca IMPLEN y posteriormente se almacenó a -20°C.

4. 3 Confirmación molecular del género, especie y el gen *bla*_{NDM}

La caracterización molecular en los aislamientos se realizó mediante PCR convencional, en reacciones independientes, usando oligonucleótidos y protocolos previamente

estandarizados en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana. Se realizó confirmación de género y especie utilizando los oligonucleótidos para amplificación de un fragmento del gen cromosomal *dnaA* (reacción 1, Tabla 1), se confirmó que los aislamientos fueran portadores del gen *bla_{NDM}* positivos mediante la amplificación de un fragmento del gen *bla_{NDM}* (reacción 2, tabla 1). Los ciclos de amplificación se describen en la tabla 2. Todos los productos amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con solución de bromuro de etidio 0,5 mg/ml revelados con un analizador de geles.

4.4 Determinación de la variabilidad plasmídica de los aislamientos de *Providencia rettgeri* que transportan el gen *bla_{NDM}*.

Una vez confirmados los aislamientos, con el fin de identificar si estos conservaban la misma estructura del plásmido p06-1619-NDM, o plásmido pBJ01-like; se amplificaron cuatro regiones plasmídicas, una perteneciente al plásmido pBJ01-like de *A. baumannii* y tres del p-06-1619-NDM de *P. rettgeri* las cuales se muestran en la figura 7.

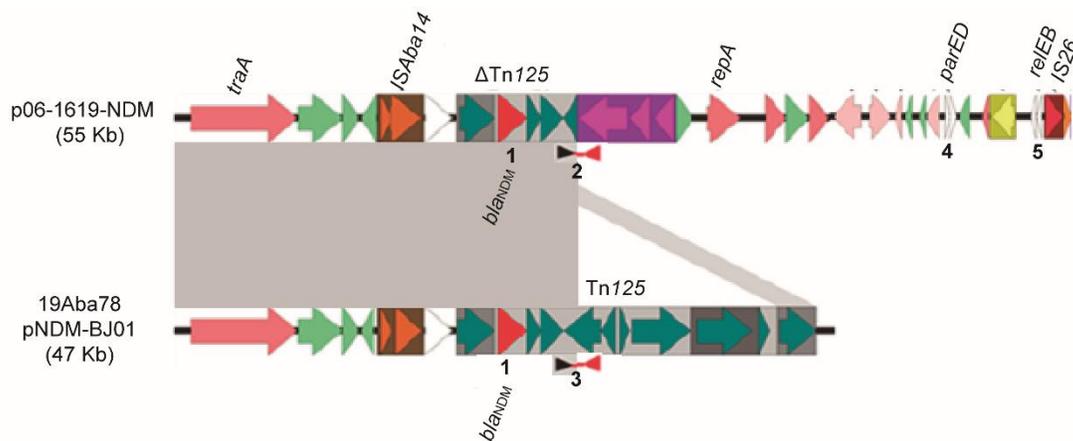


Figura 7. Regiones de reconocimiento de los oligonucleótidos empleados en PCRs independientes de las reacciones 1 a 5 descritas en la tabla 1 (los números de la figura corresponde a la reacción 2 a 6 la tabla 1). 1. reconocimiento de oligonucleótidos para el gen *bla_{NDM}*, 2. Ubicación del Δ Tn125 truncado (en el gen *tat*) por la IS6368 3. Región de reconocimiento en el Tn125 sin el truncamiento identificado en el p06-1619-NDM. Las flechas de color rojo y negro ubicadas bajo la secuencia de cada plásmido, indican el sitio de reconocimiento de los oligonucleótidos usados para identificar el cambio en el transposón Tn 125 4. Reconocimiento del gen *parD*. 5 y del gen *relB*. Las barras grises entre cada secuencia corresponden a regiones con >99% de identidad nucleotídica Tomada de (61).

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la caracterización molecular por PCR de los aislamientos del estudio

Reacción	ID	Secuencia 5'-->3'	Secuencia objetivo	Referencia
1. Confirmación de especie <i>P. rettgeri</i>	GN569	GCCCCCTTCAAGCTGAATTA	<i>dnaA</i>	(61)
	GN570	GCGTCAGTTCCACAAAAGTCA		
2. Confirmación de <i>bla</i> _{NDM}	GN438	GCCCCCTTCAAGCTGAATTA	<i>bla</i> _{NDM}	LGMB
	GN485	ACACCATTAGAGAAATTTGC		
3. Transposón Tn 125 truncado	GN575	GGCTCTTGCCCTCCAGATAGA	Δ Tn 125	(61)
	GN576	TGGCTGCGTAAATACCCCA		
4. Transposón Tn 125	GN575	GGCTCTTGCCCTCCAGATAGA	Tn 125	(61)
	GN577	TGAAACGATCATGCTGTGCC		
5. Antitoxina <i>parD</i>	GN665	GAGCTCATGGCTCGTACAACAAGTGTAAAC	<i>parD</i>	(62)
	GN666	TCTAGATTAGTGGTGATGGTGATGATGTACATTATGAGCGTTCTTCACTT		
6. Antitoxina <i>relB</i>	GN667	CATCATCACCATCACCCTAATCTAGATGGGTAGCATT AACCTGCGTAT	<i>relB</i>	(62)
	GN668	GAATTCATTATCGTCTCATCCTTGTAAATCGAGTTCA TCCAGCGTCACACGTA		

Tabla 2. Ciclos de amplificación de PCR para la caracterización molecular de los aislamientos

Secuencia objetivo	Desnaturalización inicial		Desnaturalización		Unión de primers		Extensión		Extensión final	
	Tiempo (min)	(°C)	Tiempo (min)	(°C)	Tiempo (min)	(°C)	Tiempo (min)	(°C)	Tiempo (min)	(°C)
<i>bla</i> _{NDM-1}	5:00	95	0:30	95	1:00	54	0:30	72	7:00	72
Tn 125	5:00	95	0:30	95	0:30	63	0:30	72	5:00	72
Δ Tn 125	5:00	95	0:30	95	0:30	63	0:30	72	5:00	72
<i>parD</i>	5:00	95	1:00	95	1:00	65	1:00	72	5:00	72
<i>relB</i>	5:00	95	1:00	95	0:30	70	1:00	72	5:00	72
<i>dnaA</i>	3:00	95	0:30	95	0:30	63	0:30	72	5:00	72
			30 ciclos							

La temperatura de cada ciclo está dada en °C.

Posteriormente se realizó una correlación de los resultados obtenidos por PCR y los pulsotipos obtenidos a partir de una electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) realizada previamente en México, como parte del seguimiento hecho a los aislamientos de este estudio y se seleccionaron los aislamientos que representaron a los principales clones

definidos de acuerdo a los resultados del dendrograma reportado por cervantes y colaboradores en el 2019 (63) .

4.5 Establecimiento de la secuencia del genoma de los principales clones de *Providencia rettgeri* que transportan el gen *bla_{NDM}*, en la población de estudio y comparación con los genomas reportados a nivel mundial.

4.5.1 Secuenciación y ensamblaje de los genomas

Se secuenciaron seis aislamientos mexicanos representantes de pulsotipos diferentes y que además presentan diferencias en la estructura del transposón Tn 125 con respecto a lo reportado en el plásmido p06-1619-NDM. Con estos criterios se seleccionaron inicialmente tres aislamientos para ser secuenciados mediante la tecnología de NovaSeq (Illumina, Inc.), la cual permite obtener buenos resultados de profundidad de secuenciación. Las secuencias obtenidas, se analizaron junto con el genoma de cinco aislamientos de *P. rettgeri*, de este estudio que fueron obtenidos a través del equipo de secuenciación Genome Analyzer GAIIx (Illumina, Inc.) en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México en el marco de un proyecto de investigación (63). Las secuencias obtenidas por estas dos plataformas (que generan lecturas menores a 200pb), fueron comparadas entre sí y con respecto a la secuencia del plásmido p06-1619-NDM. Aquellas que presentaron mayor diferencia con respecto al plásmido, fueron seleccionadas para ser secuenciadas mediante la tecnología de PacBio RS II (Illumina, Inc.), que da la posibilidad de obtener genomas completos, e identificar la secuencia que corresponde al cromosoma y las de los plásmidos, lo cual es importante para el análisis de los EGM que transportan el gen *bla_{NDM}*.

Para el proceso de extracción de ADN total destinado a la secuenciación, se realizó inicialmente un cultivo bacteriano en caldo LB suplementado con ceftazidima (CAZ) a 30 µg/mL, con el fin de mantener la presión selectiva para bacterias que albergaban el gen de interés, y se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se realizó una dilución 1:100 en caldo LB suplementado con CAZ [30 µg/ml] y se incubaron en shaker a 37°C, 200 rpm hasta obtener una densidad óptica (OD) de 0,6 a 625 nm. Se extrajo el ADN total usando el kit UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (QIAGEN N.V.) y se verificó la calidad del ADN extraído, mediante un control de calidad cuantitativo y cualitativo; la cuantificación

de la concentración y la revisión de las relaciones 260/280 y 260/230 en NanoDrop 2000c (BIORAD®) con el fin de descartar la presencia de proteínas y otros contaminantes; y la visualización del ADN mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,6% para evaluar la integridad del mismo usando Nanodrop y Qubit para cuantificación fluorométrica de ADN de doble cadena.

Para la secuenciación por NovaSeq6000 (Illumina, Inc.), se utilizó el kit TruSeq ADN Nano (Illumina, Inc.) para la construcción de las librerías, con el fin de obtener lecturas *paired end* de 150 nucleótidos por muestra. A las lecturas obtenidas se les realizó un control de calidad usando el programa FastQC v0.11.8 (64) y se revisó la calidad de las lecturas mediante el *phred score* >18. , Ya que estas presentaron *phred score* >18, no fue necesario el uso del programa Trimmomatic (56) para remover secuencias de adaptadores, ni cortar secuencias en los extremos de las lecturas. Posteriormente fueron ensambladas *de novo* en SPAdes v3.5.0 (65), usando los parámetros predefinidos por el programa. Para la selección de los ensamblajes se empleó el programa QUAST v5.0.2 (66), mediante el cual se seleccionaron aquellos en los que se obtuvo el menor número de contigs y mayor número de bases. Los contigs con la secuencia de nucleótidos del genoma fueron anotados para la identificación de los marcos abiertos de lectura con Prokka v1.13 (67).

Con respecto a la secuenciación de PacBio, se empleó una librería SMRTbell™ de 20kb con una selección previa por tamaño con BluePippin™ (Sage Science). Para la obtención de las lecturas se utilizó la plataforma de PacBio RS II (Illumina, Inc.) con la química P6-C4 y una SMRT cell por aislamiento. Las lecturas fueron ensambladas *de novo* usando el protocolo SMRT Analysis v2.3 (68), empleando el programa HGAP2 y HGAP3 mediante el SMRT portal. Los contigs obtenidos del ensamblaje se compararon entre ellos mismos para buscar la presencia de extremos repetidos a través de Artemis Comparison Tool (ACT) (69) y el análisis de dotplot con el programa GEPARD v1.30 (70). Posteriormente se hizo la anotación de los contigs para identificar los marcos de lectura abiertos usando Prokka v1.13 (67) y se hizo anotación manual de algunos genes que no fueron identificados previamente, mediante BLASTp y BLASTn. Adicionalmente los ensamblajes fueron evaluados haciendo un mapeo de las lecturas obtenidas, usando el programa BWA v0.7.17, primero para indexar la secuencia de cada ensamblaje con la opción BWA index y posteriormente, BWA-MEM (<http://bio-bwa.sourceforge.net/bwa.shtml>), para el alineamiento, empleando los parámetros determinados para cada tipo de lectura (71). Las opciones del algoritmo de

entrada están específicamente sugeridas por el programa para lecturas de PacBio y en el caso de las lecturas cortas se empleó la opción sugerida para lecturas pareadas ingresando los dos archivos de lectura de cada secuencia, lo que permitió observar el comportamiento de las lecturas e identificar si había zonas con lecturas atípicas en el mapeo que pudieran corresponder a artefactos del proceso de ensamblaje. Las zonas en las que se encontró decaimiento de las lecturas correspondieron a los extremos repetidos de cada *contig*, lo que se observa generalmente al obtener ensamblajes completos de una estructura circular con HGAP, como es el caso de los cromosomas y los plásmidos bacterianos (72). En dichos extremos repetidos se observó que los ORFs presentan truncamientos asociados a la baja cobertura de las secuencias, a partir del análisis de estos, se hizo un proceso de circularización manual con el fin de remover los extremos repetidos. En el proceso de circularización se eliminaron las regiones de cada extremo que presentaban menor cobertura y ORFs truncados, conservando las regiones de cada extremo que mostraban identidad del 100% en ambos extremos y que presentaban ORFs completos, revisando en el programa ACT que la secuencia de los *contigs* correspondientes a plásmidos y cromosomas quedara completa sin redundancias o deleciones. Teniendo en cuenta que el punto de inicio de las secuencias es asignado aleatoriamente durante el ensamblaje, se modificó empleando el programa Circlator (72) y usando los genes *dnaA* (definido como punto de inicio del cromosoma bacteriano) y *repA* (definido como punto de inicio de los plásmidos) en los plásmidos que cuentan con el mismo. Posteriormente, se realizó nuevamente la anotación de los genes con Prokka (67) y la curación manual del archivo en formato GenBank en Artemis mediante un análisis de BLASTn (73) y BLASTp, adicionalmente se identificó la presencia de los genes de resistencia a antibióticos empleando ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) y CARD (<https://card.mcmaster.ca/>) (74).

4.5.2 Relación filogenética de los aislamientos

Para determinar la relación filogenética de los aislamientos mexicanos estudiados con los reportados a nivel internacional, se construyó un árbol filogenético de los aislamientos secuenciados en este estudio y los aislamientos de *P. rettgeri* NDM-positivos previamente reportados, incluido el aislamiento mexicano 06-1619. Para la construcción del árbol, se tuvieron en cuenta los marcos abiertos de lectura (ORF) determinados en el proceso de anotación presentes en todos los genomas con $\geq 90\%$ de identidad nucleotídica (genes

core) fueron alineados y concatenados usando los programas Roary y PRANK (75, 76). Las posiciones con alineamientos pobres o regiones altamente divergentes fueron eliminadas usando Gblocks (77). Posteriormente se construyó el árbol filogenético de máxima verosimilitud usando el programa RAxML versión 8.2.9 (78) bajo el modelo general de tiempo reversible (GTRCAT) y se visualizó en Dendroscope (79).

4.6 Análisis de las diferencias en las plataformas de movilización de *bla*_{NDM} de los aislamientos de *Providencia rettgeri* del hospital de México con respecto a aislamientos previamente reportados.

Una vez identificados los posibles marcos abiertos de lectura, se realizó una curación manual de la anotación en las zonas adyacentes a las que codifica *bla*_{NDM}, utilizando el software BLASTp, BLASTx y BLASTn (80), estos marcos abiertos de lectura fueron corregidos en el archivo en formato GBK obtenido en el programa de anotación Prokka (67) y visualizados en Artemis. Se realizó un análisis genómico comparativo para evaluar la presencia y relación entre los plásmidos NDM-positivos identificados en los aislamientos de *P. rettgeri* incluidos en el estudio y los plásmidos con los que se encontró relación, previamente reportados en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Para la identificación de los plásmidos con el gen *bla*_{NDM} se realizó un alineamiento pareado del genoma con los plásmidos reportados en el NCBI mediante BLASTn y se hizo una búsqueda de los grupos de incompatibilidad usando PlasmidFinder (81). Finalmente, los resultados fueron ilustrados en EasyFig v2.2.2 y BRIG v0.95 (82, 83).

Con el fin de establecer las diferencias o similitudes de las plataformas de movilización del gen de interés en los aislamientos de estudio, se realizaron alineamientos pareados con la secuencia del p06-1619-NDM, teniendo en cuenta que el aislamiento proviene de la misma institución de origen. Por otro lado, se cuenta con información de secuenciación del aislamiento de Bogotá de *P. rettgeri* NDM positivo 16Pre47, secuenciada en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana por MiSeq y PacBio RS II. Este aislamiento cuenta con la maquinaria de conjugación conocida como Tra1, región asociada a la transferencia del plásmido, descrita por Fernandez-Alarcon y colaboradores, frecuentemente encontrada en los plásmidos de gran variedad de bacterias (47, 54, 70, 84).

5 RESULTADOS

5.1 Co-circulación de diferentes clones de *Providencia rettgeri* portadores del gen *bla_{NDM}* en un hospital de México.

En este estudio fueron analizados 19 aislamientos mexicanos de *Providencia rettgeri*, portadores del gen *bla_{NDM}*, recuperados del hospital en donde esta especie fue identificada por primera vez albergando el gen de resistencia *bla_{NDM}* en México (18). Estos aislamientos fueron enviados al Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque, en donde mediante técnicas de biología molecular, se confirmó que todos los aislamientos correspondieron a *P. rettgeri*, y portan el gen *bla_{NDM}*

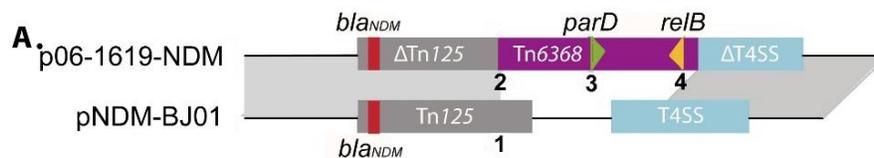
Con el fin de identificar si en los 19 aislamientos, el gen *bla_{NDM}* tenía el mismo entorno genético que el plásmido p06-1619-NDM (pNDM-BJ01-like), se realizó la determinación molecular del gen *tat* del Tn 125 y de la posterior inserción de la IS6368 en este gen, evento observado en p06-1619-NDM. La determinación de la presencia del Tn 125 es importante, ya que usualmente es el elemento genético móvil que ha sido asociado al gen *bla_{NDM}* en diferentes especies (11, 52). El gen *tat* fue identificado en 14 (73,7%) aislamientos, lo que sugiere que posiblemente estos albergaron a *bla_{NDM}* en un entorno asociado al Tn 125 diferente al reportado en el p06-1619-NDM. Así mismo, se determinó a Δ *tat* con la inserción de la IS6368 en dos aislamientos (10,5%), por lo que probablemente estos sí conservan una estructura similar al plásmido p06-1619-NDM. En contraste, tres (15,8%) aislamientos, 121000, 06-1617 y 12110, no amplificaron para ninguna de estas dos regiones, lo que sugiere que estos tienen diferencias en la región del Tn 125 o que movilizan a *bla_{NDM}* en otro elemento genético.

En el plásmido p06-1619-NDM de *P. rettgeri*, además de la inserción de la IS6368 en el Tn 125, fueron hallados los sistemas de muerte post-segregacional (toxina-antitoxina) ParDE y RelEB, por lo que estos fueron también evaluados en este estudio. Los genes que codifican para las antitoxinas ParD y RelB, fueron identificados en 19 (100%) y 18 (94,7%) aislamientos, respectivamente. Lo que sugiere que los aislamientos, a excepción del 06-1622, posiblemente pueden tener los dos sistemas de muerte post-segregacional. Aunque el plásmido p06-1619-NDM no pertenece a algún grupo de incompatibilidad conocido, en *P. rettgeri* y en otras enterobacterias han sido descritos plásmidos pertenecientes a otros

grupos como A/C, FIA y FIB, por lo que se realizó la búsqueda de estos en los aislamientos, sin embargo, no fueron encontrados en ninguno de ellos (anexo 1) (59).

También se analizó la relación genética de los nuevos aislamientos respecto a la cepa 06-1619 por PFGE (determinación realizada previamente por el Instituto Nacional de Salud Pública de México), encontrando siete pulsotipos diferentes, siendo los más frecuentes los pulsotipos A, B y E con cuatro (21,0%) aislamientos cada uno; seguido por los pulsotipos C y D, con tres (15,8%) y dos (10,5%) aislamientos, respectivamente (Figura 8). Finalmente, los pulsotipos G y H fueron de único aislamiento (5.2%). Estos resultados muestran que algunos aislamientos parecen estar relacionados con la cepa inicial, sin embargo, también hay co-circulación de otros clones en el hospital (Figura 8).

La correlación de la relación genética de los aislamientos con la caracterización molecular de las regiones plasmídicas permitió identificar a aquellos aislamientos de pulsotipos diferentes que presentaron regiones con mayor variabilidad. Teniendo en cuenta los resultados de los cuatro aislamientos del pulsotipo A, se puede evidenciar que son idénticos en las regiones analizadas, con excepción del aislamiento 12100, el cual no cuenta con la región del gen *tat*, por lo que probablemente este tiene una estructura diferente de movilización. En el pulsotipo B, se agruparon los tres primeros aislamientos mexicanos reportados de *P. rettgeri* con el gen *bla_{NDM}* y el aislamiento 12104 recuperado un año después, este aislamiento tuvo resultados idénticos al aislamiento 06-1619, por lo que posiblemente puede albergar el plásmido p06-1619-NDM. En el pulsotipo C, se evidencia en los tres aislamientos la presencia del gen *tat* del Tn125 y los genes para las antitoxinas ParD y RelB. Por su parte, los dos aislamientos del pulsotipo D también codificaron estas antitoxinas, pero presentaron diferencias en la región de *tat*, encontrándose ausente en el aislamiento p12110. Los resultados de la caracterización de las regiones plasmídicas en los cuatro aislamientos del pulsotipo E fueron idénticos, todos tienen la región de *tat*, y los dos sistemas de muerte post-segregacional, al igual que los aislamientos de los pulsotipos F y G, lo que sugiere que estos aislamientos tienen diferencias con el plásmido p06-1619-NDM (Figura 8).



	Pulsotipo	Aislamiento	Marcadores moleculares				Tecnología de secuenciación			
			Tn125	ΔTn125	<i>parD</i>	<i>relB</i>	Genome Analyzer	Novaseq	Miseq	PacBio
	A1	12106	■		■	■				
	A2	12103	■		■	■				
	A3	12100			■	■	■			■
	A4	12102	■		■	■				
	B1	12104			■	■				
	B1	06-1619			■	■				■
	B2	06-1623	■		■	■			■	
	B3	06-1617			■	■			■	
	C1	3295	■		■	■				
	C1	3298	■		■	■				
	C2	3297	■		■	■	■	■		
	D1	12110			■	■		■		
	D2	12111	■		■	■	■			
	E1	12108	■		■	■				
	E2	12105	■		■	■	■			■
	E2	12109	■		■	■				
	E2	3299	■		■	■	■			
	F	06-1622	■		■	■				
	G	3296	■		■	■		■		■

Figura 8. Relación genética de los aislamientos respecto a la cepa 06-1619 (recuadro rojo y secuenciados por Márquez y colaboradores, 2017), presencia de algunos marcadores moleculares y tecnología de secuenciación. (A) Esquema de la localización de los marcadores moleculares usados para rastrear los plásmidos p06-1619-NDM y pNDM-BJ01, (B) Relación genética y molecular de los aislamientos; columnas de izquierda a derecha: patrón de bandas de PFGE, pulsotipos, código del aislamiento, presencia (recuadro sombreado) /ausencia de los marcadores moleculares y aislamientos secuenciados y tecnología empleada.

El Instituto Nacional de Salud Pública de México además de analizar la relación genética, secuenció previamente con la plataforma Genome Analyzer, el genoma de los aislamientos 12100 (pulsotipo A), 3297 (pulsotipo C), 12111 (pulsotipo D), 12105 (pulsotipo E) y 3299 (pulsotipo E). Estos genomas fueron ensamblados y comparados con el plásmido p06-

1619-NDM del aislamiento 06-1619 y con los genomas parciales de los aislamientos 06-1617 y 06-1623 secuenciados por Miseq (17). Mediante el análisis de genómica comparativa con el plásmido p06-1619-NDM se determinó que la cobertura y la identidad de los aislamientos 3297, 3299, 12100, 12105 y 12111 tenían 34 a 44% de cobertura y 99 a 100% de identidad. También se hizo *mapping* con las lecturas de estas secuencias, a partir de lo cual se pudo observar que todas presentan una cobertura parcial con la región de virulencia y resistencia de p06-1619-NDM, esto se pudo verificar por medio de alineamientos pareados que muestran las regiones con las que conservan identidad (anexo 2A).

5.2 Los principales clones de *Providencia rettgeri* que portan el gen *bl_{NDM}*, en la población de estudio presentan plásmidos diferentes portando el gen *bl_{NDM}*

Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionaron para secuenciación genómica a seis aislamientos de los principales clones. La elección de la tecnología empleada se hizo con base a las diferencias genéticas con el aislamiento 06-1619 (pulsotipo B). Por tanto, fueron secuenciados por NovaSeq los aislamientos 3297 (pulsotipo C) y 3296 (pulsotipo F), ambos presentan amplificación del Tn 125, pero son de pulsotipos muy diferentes y por otro lado el aislamiento 12110 (pulsotipo D) que no presentó amplificación para ninguna de las dos regiones evaluadas del Tn 125; y para la elección de aislamientos secuenciados por PacBio, se tuvo en cuenta los resultados de caracterización molecular y los resultados de genómica comparativa de los genomas obtenido por Genome Analyzer y Novaseq, los cuales se compararon con el plásmido p06-1619-NDM. Se seleccionaron entonces los aislamientos 12100 (pulsotipo A), 12105 (pulsotipo E) y 3296 (pulsotipo F), dado que mostraron mayores diferencias en su estructura genética con respecto a los demás y esta tecnología permite obtener contigs más largos y en muchas ocasiones genomas completos (72) (anexo 2A).

Una vez secuenciados, se realizó el control de calidad de las lecturas y posteriormente fueron ensambladas de acuerdo con lo establecido para cada tecnología de secuenciación. En la tabla 3 se muestra la longitud y el número de contigs obtenidos para cada aislamiento. Para los aislamientos 12100, 12105 y 3296, secuenciados mediante PacBio, se analizó adicionalmente la presencia de posibles extremos repetidos, sugestivos de estructuras circulares completas (anexo 3). El genoma del aislamiento 12100 está constituido por un

cromosoma de 4.347.442 pb y dos plásmidos, p12100-NDM y p12100-PER, de 118.246 pb y 315.510 pb, respectivamente. Ninguno de estos dos plásmidos pertenece a alguno de los grupos de incompatibilidad reportados hasta la fecha (Tabla 4). El aislamiento 12105 está constituido por un cromosoma de 4.580.742 pb y un plásmido p12105-NDM de 82.210pb no reportado en algún grupo de incompatibilidad descrito a la fecha. Por su lado, el aislamiento 3296 presenta un cromosoma de 4.673.530pb y un plásmido p3296-NDM de 154.144 pb reportado en el grupo de incompatibilidad IncT de acuerdo a lo reportado por PlasmidFinder (81).

Una vez determinado el genoma completo de los tres aislamientos secuenciados por PacBio, se analizaron los marcos abiertos de lectura y se buscó en estos la ubicación tanto del gen *bla*_{NDM} como de otros genes de resistencia, permitiendo la obtención del resistoma. En el aislamiento 3296 el cromosoma codifica los genes para la aminoglicósido nucleotidil-transferasa AadA y la dihidrofolato reductasa Dfr1 y el plásmido p3296-NDM alberga los genes de resistencia *bla*_{NDM}, *bla*_{TEM}, *mph(A)* y se observó la presencia de un integron clase 1 con los genes *sul1-qacEΔ1-bla*_{OXA}-*aadA1-aac(6')-lb-cr* que confiere, disminución de la susceptibilidad a fluoroquinolonas como ciprofloxacina. En el aislamiento 12100, el cromosoma codifica los genes para la aminoglicósido nucleotidil-transferasa AadA y la dihidrofolato reductasa Dfr1; el plásmido p12100-NDM alberga los genes de resistencia *bla*_{NDM} y *rmtB*, en el plásmido p12100-PER, se identificó el gen de resistencia a betalactámicos *bla*_{PER} y los genes de resistencia. *aadA1b*, *bla*_{PER-1}, *aac(6')lb-cr*, *sul1*, *aac(6')lb3*, *mph(A)*, *rmtB2*. En el aislamiento 12105, el cromosoma codifica los genes para la aminoglicósido nucleotidil-transferasa AadA1b y el plásmido p12105-NDM alberga los genes de resistencia *bla*_{NDM}, *tet* y el gen *aadA1* (tabla4).

En el caso de los aislamientos secuenciados por segunda generación, se verificó la integridad y la ubicación de los marcos abiertos de lectura del gen *bla*_{NDM}, así como la presencia y ubicación de los genes *parED* y *relEB*, que codifican para los sistemas toxina-antitoxina usados como marcadores moleculares, los cuales fueron encontrados en las secuencias analizadas (anexo 2B).

Tabla 3. Estadísticas generales para los ensamblajes obtenidos en este estudio.

Aislamiento	Tecnología	Total de lecturas	Total de bases	Número de contigs	Longitud del contig más largo (pb)	Tamaño del ensamblaje	GC (%)	N50	N75	L50	L75	# N's por 100 kbp
3297	GA	5.641.922	428.786.072	421	121688	4686036	40.93	37279	20336	40	83	0.00
3299	GA	6.763.304	514.011.104	777	58197	4714752	40.56	17881	9593	80	168	0.00
12100	GA	8.756.544	665.497.344	565	199125	4879417	41.16	38756	20884	36	81	0.00
12105	GA	5.513.392	419.017.792	532	111462	4673450	40.48	24751	14367	57	120	0.00
12111	GA	8.904.047	676.707.572	498	140008	4803511	41.10	27244	15004	51	111	0.00
3296	NS	21.784.608	3.289.475.808	62	548586	4784401	40.42	331984	219976	6	10	0.00
3297	NS	17.849.232	2.695.234.032	144	394254	4798297	40.27	157727	92345	10	20	0.00
12110	NS	19.939.704	3,010.895.304	149	394254	4797715	40.27	157727	92345	10	20	0.00
3296	PB	115.494	1.168.833.991	2	4673530	4827674	40.52	4673530	4673530	1	1	0.00
12100	PB	154.524	1.529.618.832	3	4347442	4781198	40.85	4347442	4347442	1	1	0.00
12105	PB	102.824	1.118.372.034	2	4580742	4662952	40.29	4580742	4580742	1	1	0.00

GA: Genome analyzer

NS: NovaSeq

PB: PacBio

Tabla 4. Descripción general de los genomas obtenidos y su resistoma.

Aislamiento	Tipo de ADN circular	Contig	Tamaño (pb)	Profundidad (X)	Grupo de incompatibilidad	Genes de resistencia
3296	Cromosomal	p3296-CH	4.673.530	202	N/A	<i>aadA1, dfrA1</i>
	Plasmídico	p3296-NDM	154.144	304	IncT	<i>aadA1b, bla_{TEM-1B}, bla_{OXA-2}, aac(6')Ib-cr, sul1, aac(6')Ib3, qnrA1, mph(A), bla_{NDM-1}</i>
12100	Cromosomal	Cromosoma	4.347.442	261	N/A	<i>aadA1, dfrA1</i>
	Plasmídico	p12100-NDM	118.246	365	N/D	<i>bla_{NDM-1}, rmtB2</i>
	Plasmídico	p12100-PER	315.510	250	N/D	<i>aadA1b, bla_{PER-1}, aac(6')Ib-cr, sul1, aac(6')Ib3, mph(A), rmtB2</i>
12105	Cromosomal	Cromosoma	4.580.742	203	N/A	<i>aadA1b</i>
	Plasmídico	p12105-NDM	120.597	173	N/D	<i>bla_{NDM-1}, aadA1, tet</i>
3297	N/A	N/A	4.686.036	-	Col3M	<i>aadA1b, aac(6')-Ib3, rmtB2, aadA1b, bla_{NDM-1}, bla_{TEM-116}, bla_{PER-1}, aac(6')-Ib-cr, qnrD1, mph(A), sul1, dfrA1</i>
3299	N/A	N/A	4.714.752	-	Col3M	<i>bla_{NDM-1}, bla_{TEM-116}, bla_{PER-7}, ant(2'')-Ia, sul1, tet(59), dfrA1, aadA1, aadA14, aph(3')-VIa, qnrD1, Inu (G)</i>
12110	N/A	N/A	4.797.715	-	Col3M	<i>aadA1, ant(2'')-Ia, aph(3')-VIa, bla_{NDM-1}, bla_{PER-7}, Inu(G), qnrD1, sul1, tet, dfrA1</i>
12111	N/A	N/A	4.803.511	-	Col3M	<i>aac(6')-Ib-cr, aadA1, bla_{TEM-116}, bla_{PER-7}, bla_{NDM-1}, qnrD1, Erm(42), catB3, Sul1, sul2, tet(57), tet(31), dfrA1</i>

N/D: no determinado

Para identificar genes de resistencia presentes en los diferentes contigs de estos aislamientos, se empleó la plataforma Resfinder (74). En el aislamiento 3297, el gen *bla_{NDM}* fue encontrado en el contig 119 y se identificaron adicionalmente, los genes de resistencia *aadA1b*, *aac(6')-Ib3*, *rmtB2*, *aadA1b*, *bla_{TEM-116}*, *bla_{PER-1}*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrD1*, *mph(A)*, *sul1*, *dfrA1*. En el aislamiento 3299, el gen *bla_{NDM}* fue encontrado en el contig 423 y se identificaron adicionalmente, los genes de resistencia *bla_{TEM-116}*, *bla_{PER-7}*, *ant(2'')-Ia*, *sul1*, *tet(59)*, *dfrA1*, *aadA1*, *aadA14*, *aph(3')-VIa*, *qnrD1*, *Inu(G)*. En el aislamiento 12110, el gen *bla_{NDM}* fue encontrado en el contig 43 y adicionalmente se identificaron los genes de resistencia *aadA1*, *ant(2'')-Ia*, *aph(3')-VIa*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{PER-7}*, *Inu(G)*, *qnrD1*, *sul1*, *tet*, *dfrA1*. Finalmente en el aislamiento 12111, el gen *bla_{NDM}* fue encontrado en el contig 129 y los genes de resistencia identificados fueron *aac(6')-Ib-cr*, *aadA1*, *bla_{TEM-116}*, *bla_{PER-7}*, *bla_{NDM-1}*, *qnrD1*, *Erm(42)*, *catB3*, *Sul1*, *sul2*, *tet(57)*, *tet(31)*, *dfrA1* (tabla 4).

Por otro lado, se estableció la relación filogenética de los aislamientos secuenciados usando un análisis basado en sus variaciones nucleotídicas puntuales (SNP's) en su genoma conservado o "core genome". Adicionalmente, en el análisis se incluyeron 21 genomas completos de *P. rettgeri* (con y sin *bla_{NDM}*) reportados en la base de datos de genomas del NCBI, entre los que se encuentran: tres genomas de México, cuatro de Colombia (uno de Bucaramanga y tres de Bogotá), uno de China, cuatro de Japón, uno de Estados Unidos y uno que no especifica el país de origen. En el análisis filogenético, los aislamientos se distribuyeron en tres ramas y sin relación con el país de origen (Figura 9). Curiosamente, los seis aislamientos de este estudio, a pesar de haber sido colectados en el mismo hospital de México, se agruparon en diferentes clados, sugiriendo diferencias en su genoma conservado. Los aislamientos 12105, 12110 y 3299 tuvieron mayor relación genética con los aislamientos colombianos 16Pre45 y RB151. Por su parte, los aislamientos 3297, 12111 y 12100, se agruparon con aislamientos del mismo origen (06-1619, 06-1617 y 06-1623); y finalmente el aislamiento 3296 se encuentra separado de los demás aislamientos mexicanos y presenta mayor relación con el grupo en el que se encuentran genomas reportados en Japón (BML2526, BML2576, BML2496, BML2531), China (Pr_15_2_50) y dos genomas colombianos (16Pre36 y 16Pre47). Tomando juntos estos resultados sugieren que, en el hospital de estudio, convergen aislamientos que corresponden a diferentes clones de *P. rettgeri* que portan el gen *bla_{NDM}* en diferentes plásmidos, que no son de circulación específica de la región.

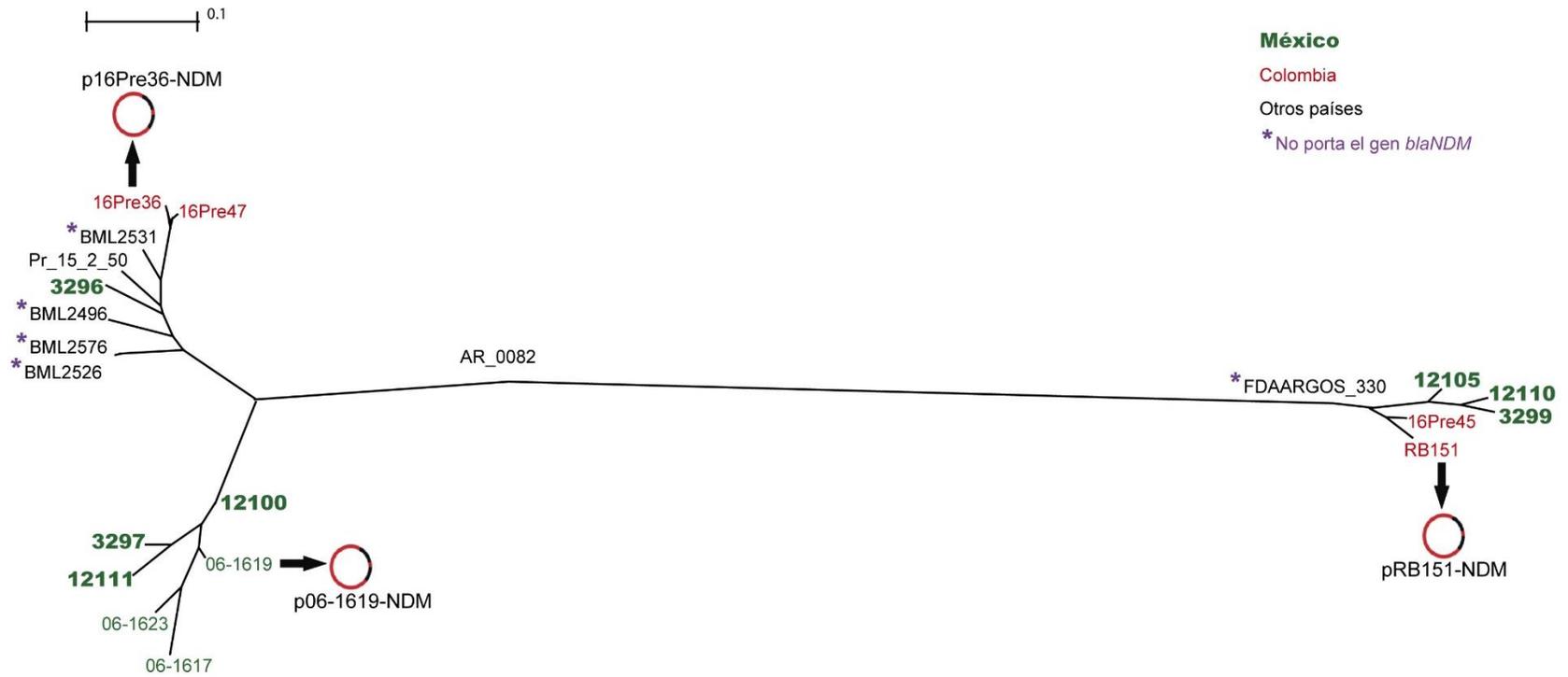


Figura 9. Relación genética basado en los SNP's del "core-genome" de *Providencia rettgeri*. Se muestran los aislamientos de este estudio y los genomas completos reportados para *P. rettgeri* en la base de datos de genomas del NCBI. El árbol de máxima verosimilitud (ML, maximum likelihood) fue construido basado en los SNP's del core-genome obtenidos a partir de genomas completos y genomas parcialmente ensamblados obtenidos en este estudio.

5.3 El gen *bla*_{NDM-1} es transportado en diferentes estructuras plasmídicas en los aislamientos de *Providencia rettgeri* del hospital de México.

De acuerdo con los datos de la secuenciación, el gen *bla*_{NDM-1} está localizado en tres plásmidos de diferentes tamaños, y una comparación rápida muestra que son estructuralmente muy diversos, pero mantienen algunas características en común (Figura 10). Un análisis preliminar de la estructura general de los plásmidos permitió establecer que, aunque tenían estructuras genéticas diferentes entre ellos, los plásmidos presentan, una alta cobertura con el plásmido p06-1619-NDM en la región asociada a la estructura formada por las IS6368 a manera de transposón compuesto clase 1 y el Tn125 p12105-NDM (96%), p3296-NDM (96%) y p12100-NDM (75%) (Figura 10).

Teniendo en cuenta estos hallazgos, con el fin hacer un análisis genómico comparativo más detallado, se realizaron comparaciones pareadas de cada plásmido obtenido en este estudio con el p06-1619-NDM y con el plásmido con el que presentaron mayor relación teniendo en cuenta la comparación realizada con la base de datos de genomas del NCBI. Estos alineamientos fueron visualizados en ACT (69), donde se compararon los elementos genéticos móviles presentes en el entorno del gen *bla*_{NDM} y se analizaron las secuencias flanqueantes de los mismos con el fin de analizar las posibles movilizaciones asociadas a estos. Los resultados de estos alineamientos fueron graficados en Easyfig (82). La estructura de estos plásmidos se describe en detalle a continuación.

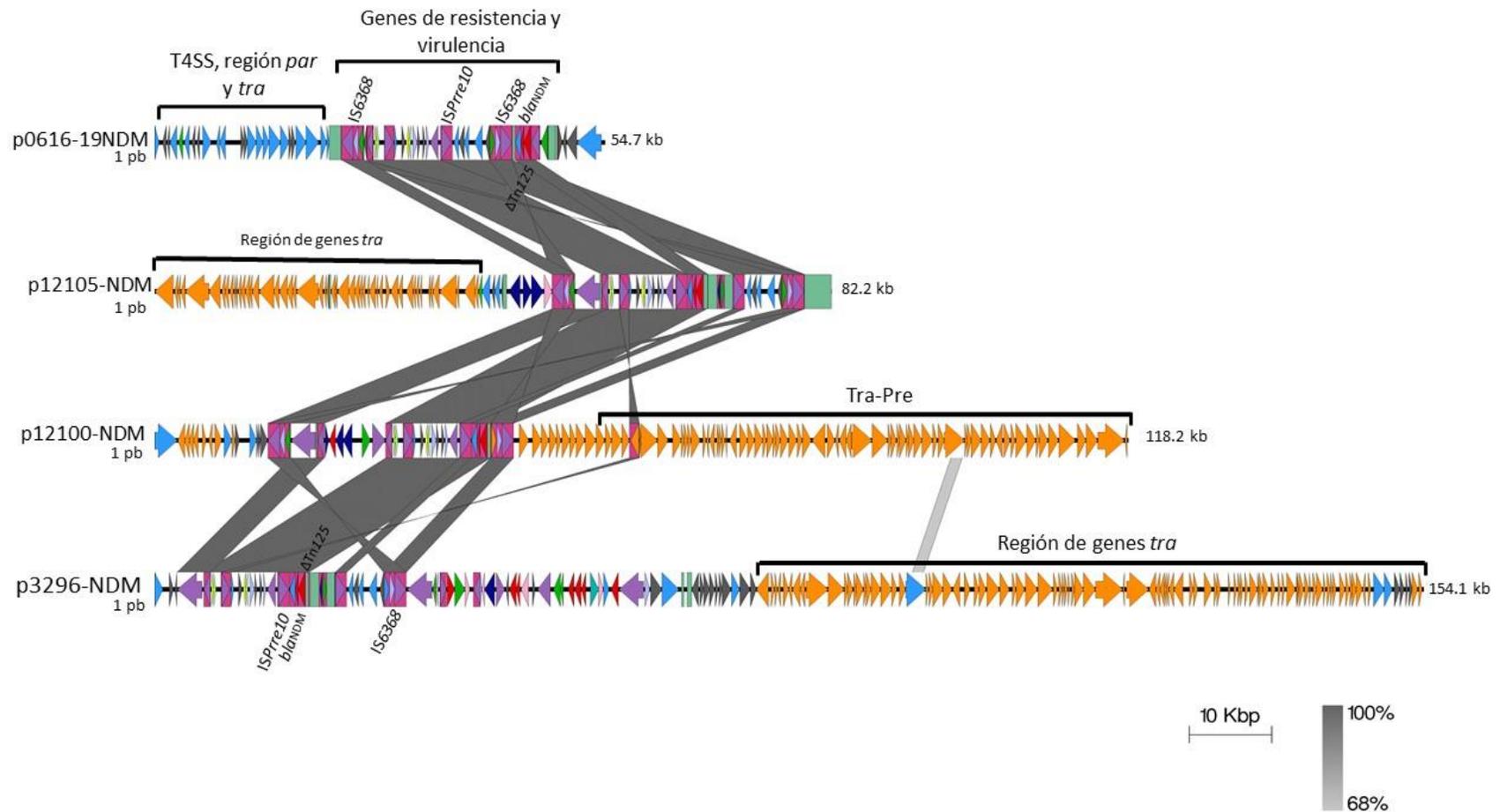


Figura 10. Descripción general de los plásmidos *bla*NDM-1 positivos de los tres aislamientos completamente secuenciados de *P. rettgeri*, comparados con la secuencia del plásmido p06-1619-NDM. Se muestran las regiones que codifican genes de replicación, regiones de resistencia y virulencia y regiones que codifican elementos genéticos móviles. El plásmido p12100-NDM presenta una región Tra reportada solo en *P. rettgeri* (Tra-Pre) y los otros plásmidos presentan regiones Tra diferentes. Los plásmidos p12105-NDM y p3296-NDM presentan genes *repA*. Las secuencias de inserción y transposones se muestran como rectángulos con sus respectivos genes para transposición y accesorios como flechas en su interior. Las barras grises entre las parejas de plásmidos muestran regiones de >68% de identidad nucleotídica.

El plásmido p12105-NDM fue encontrado en el aislamiento de *P. rettgeri* 12105, su tamaño es de 82,2 Kb y no pertenece a ningún grupo de incompatibilidad conocido (Figura 10). Presenta una identidad de >93,53% en el 64% de su cobertura con el plásmido pRB151-NDM reportado en un aislamiento de *P. rettgeri* de Bucaramanga. Gran parte de la estructura genética con la que presenta identidad el plásmido p12105-NDM corresponde a una región de genes *tra* con la inserción de 5 genes hipotéticos corriente arriba del gen *traH* y hacia el centro del plásmido se encuentra una región variable en la que se encuentra un grupo de genes par, genes para el metabolismo y adaptación de la bacteria. Por otro lado, presenta una identidad de 99.84% en el 30% de su cobertura con el plásmido p06-1619-NDM, encontrado en un aislamiento de *P. rettgeri* de México 06-1619 (17). Esto corresponde con una región de virulencia y resistencia en la que se encuentran dos copias idénticas de la IS6368, conformando una estructura a manera de transposón compuesto clase 1 con secuencias flanqueantes diferentes, lo que sugiere que esta estructura posiblemente no se insertó como un transposón compuesto, de acuerdo con los modelos propuestos para la IS26, la cual ha sido usada para estudiar este tipo de movilización (85, 86).

La orientación de los genes presentes en esta estructura están igual que en el p06-1619-NDM, al interior de esta estructura se encuentra el gen *repA*. Corriente abajo presenta la inserción de dos copias idénticas de una nueva secuencia de inserción, registrada en este estudio con el número ISPrre10 en la base de datos de ISfinder (87). Esta inserción está flanqueando el Tn125 truncado de tal forma que se observa un fragmento grande del gen *tat* justo después de la primera copia de ISPrre10, corriente abajo la estructura interna del Tn125, presenta un truncamiento de *groEL* y la ISAb125, sugiriendo un evento de inversión en la estructura conocida del Tn125. El fragmento faltante del gen *tat*, se encuentra justo antes de la segunda copia de la ISPrre10. Seguido a esta estructura están presentes los genes de dos sistemas toxina-antitoxina (*parED* y *relEB*), las secuencias de inserción IS5 e IS26 y una copia truncada de un TnAs3-like cuya IRR está flanqueada por la segunda copia de la IS6368 (Figura 11).

Con respecto a las secuencias flanqueantes dentro de la región delimitada por las IS6368, se observó que son idénticas a las reportadas para el p06-1619-NDM, excepto del lado de la IS26 que esta corriente arriba del TnAs3-like truncado. Las dos copias de la ISPrre10 presentan una posición interesante, ya que son los elementos genéticos móviles (EGM) con

mayor proximidad al $\Delta Tn 125$, flanqueando los dos extremos de este elemento en el que se encuentra el gen *bla_{NDM}* (Figura 11).

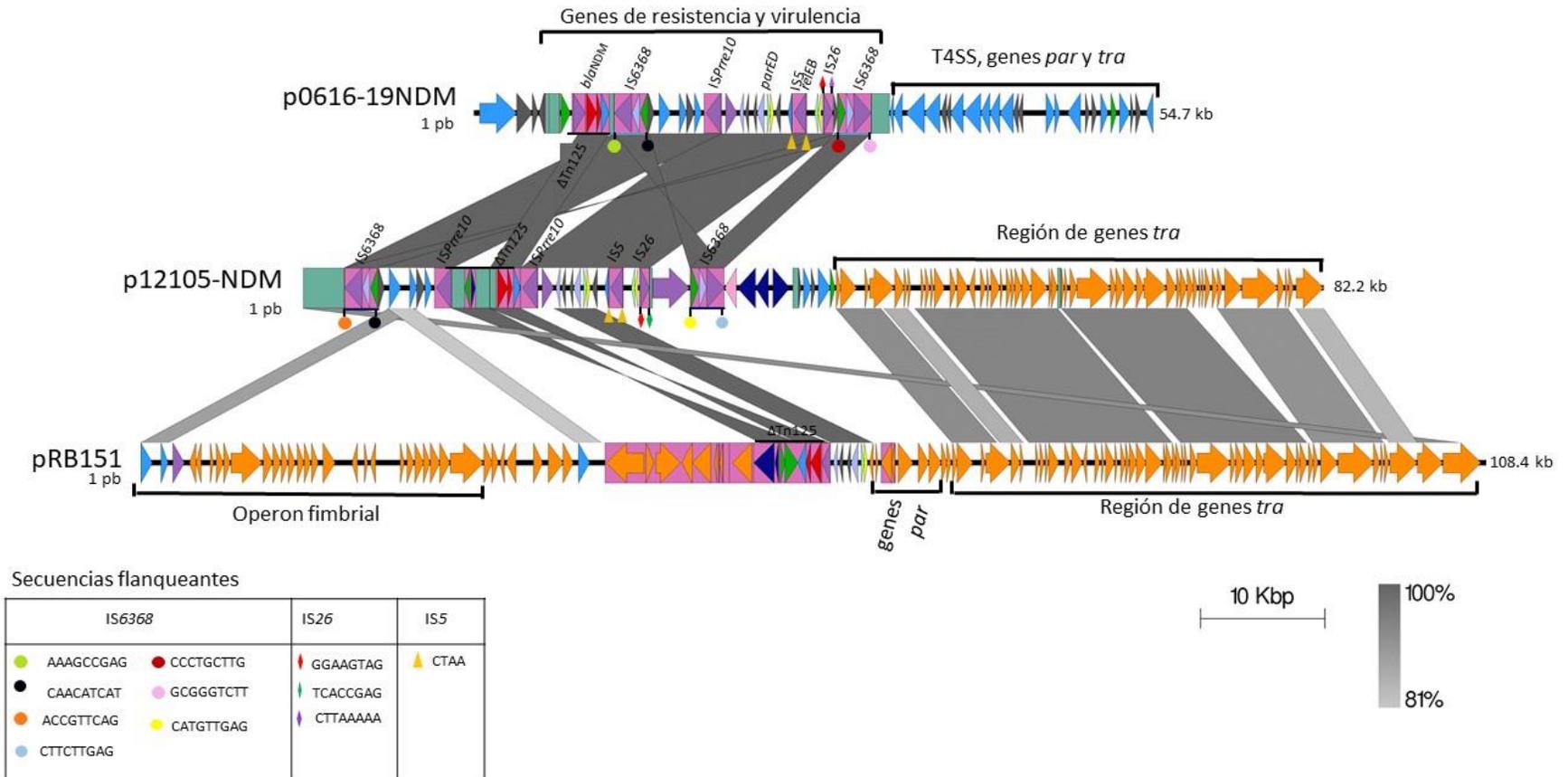


Figura 11. Comparación pareada de los plásmidos p06-1619-NDM, p12105-NDM y pRB151-NDM identificados en *P. rettgeri*. Las regiones de genes *tra*, *par*, genes de resistencia y virulencia están delimitadas por líneas negras. Las secuencias flanqueantes de las ISs que fueron analizadas están marcadas con círculos para la IS6368, rombos para la IS26 y triángulos para la IS5 y sus respectivas secuencias se encuentran descritas en la tabla inferior. Las barras grises entre las parejas de plásmidos muestran regiones de >80% de identidad nucleotídica.

Plásmido p12100-NDM: este plásmido fue encontrado en el aislamiento de *P. rettgeri* 12100, presenta un tamaño de 118.2 kb. y tampoco fue asociado a los grupos de incompatibilidad conocidos. La secuencia de este plásmido fue comparada con la base de datos de genomas del NCBI y se observó que presenta 100% de identidad en el 80% de la cobertura con el plásmido p06-1619-1, el cual fue identificado también en el aislamiento de *P. rettgeri* de México 0616-19 y presenta un 99,94% de identidad en el 63% de su cobertura con el plásmido pPrY2001, encontrado en un aislamiento de *P. rettgeri* de Canadá (17). La región conservada con estos plásmidos codifica para la maquinaria de transferencia conjugativa Tra-Pre, descrita en plásmidos de *P. rettgeri* como el pPrY2001 y en el plásmido p06-1619-1 (17, 60). Esta corresponde a más de la mitad del plásmido, por lo que se incluyó en la comparación al plásmido pPrY2001, con el fin de ver si presenta identidad en la región variable del p12100. Se analizaron los EGM presentes en el entorno del gen *bla_{NDM}* iniciando con una IS5 que se encuentra en la región Tra-Pre, la cual presenta secuencias flanqueantes diferente entre sí, pero se comparten con las del p06-1619-1.

Hacia el centro del plásmido, en la zona que varía con respecto al p06-1619-1, se encuentra una región de virulencia y resistencia que conserva una identidad de 99,84% con una región descrita en el plásmido p06-1619-NDM en la que se encuentran dos copias idénticas de la IS6368, conformando una estructura a manera de transposón compuesto clase 1 (86). Las secuencias flanqueantes de estas IS son diferentes entre sí, por lo que en este caso tampoco se sugiere que la inserción de esta estructura se haya dado como transposón compuesto sino probablemente como una unidad translocativa. Se hizo comparación de las secuencias flanqueantes de esta IS6368 con respecto a las copias de los plásmidos del alineamiento y tampoco presentan relación con las dos copias de IS6368 presentes en el p06-1619-NDM y ni con la copia del p06-1619-1.

Al interior de la estructura formada por las copias de IS6368, se halló el Tn125 truncado al inicio de la ISAb₁₂₅ por una copia de la IS6368, y en el otro extremo del remanente del Tn125, se encuentra un pequeño fragmento del gen *tat*, truncado por la nueva ISPr_{re10}. Corriente arriba de esta IS, se encuentran los genes de los sistemas toxina- antitoxina (*parED* y *relEB*), con la misma disposición que en el plásmido p06-1619-NDM, al igual que la secuencia de inserción IS5, que presenta TSDs iguales a los del p06-1619-NDM. A diferencia del plásmido p06-1619-NDM, en esta región no se observa el gen *repA*, pero se observa en su lugar dos copias de IS26, junto con los genes de una transposasa putativa de la familia IS91, 5 genes adicionales de adaptación y transporte de iones y una copia

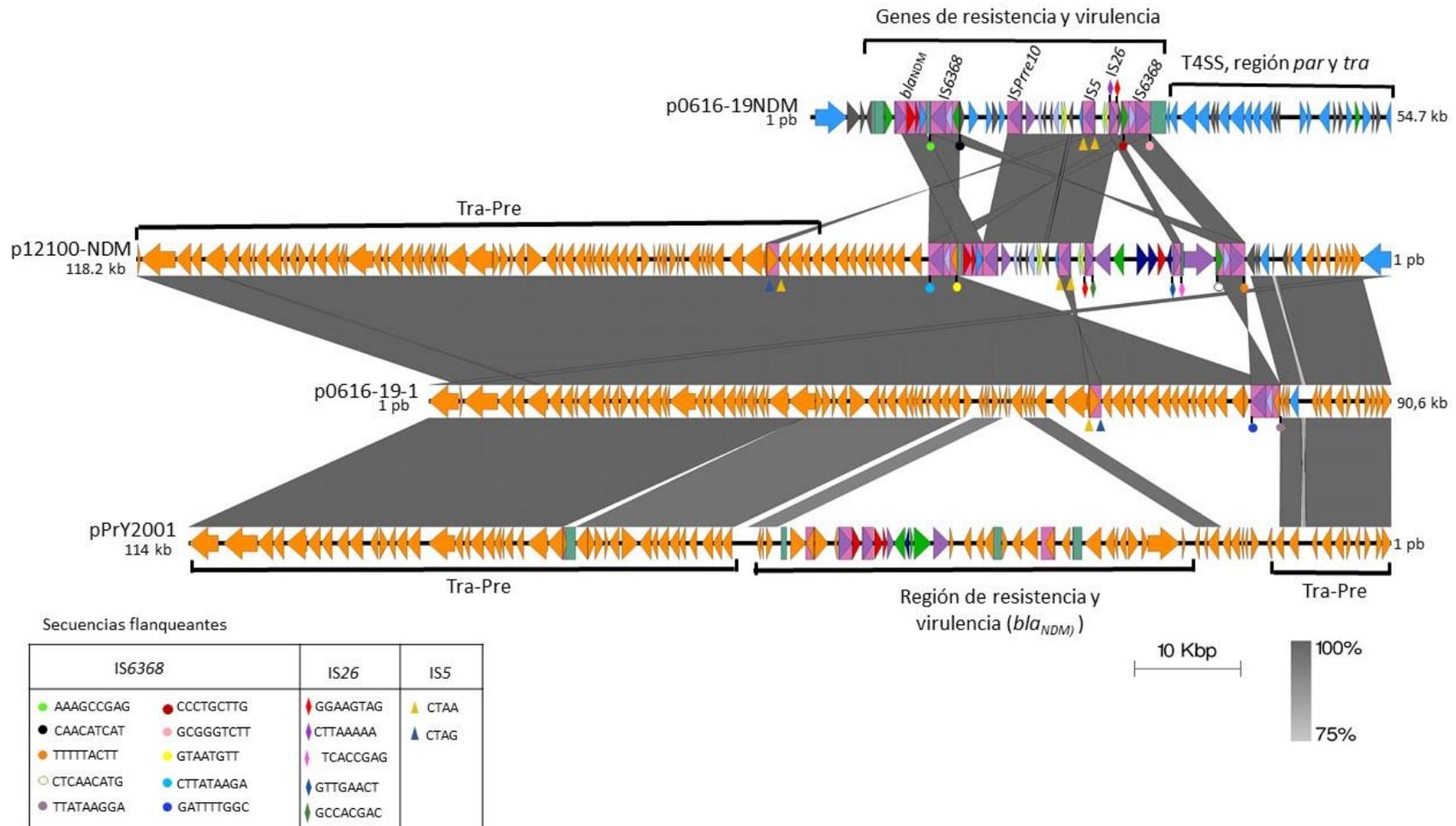


Figura 12. Comparación pareada de los plásmidos p06-1619-NDM, p12100-NDM, p06-1619-NDM-1 y pPrY2001-NDM de *P. rettgeri*. Las regiones Tra-Pre, las de genes *par*, genes de resistencia y virulencia están delimitadas por líneas negras. Las secuencias flanqueantes de las ISs que fueron analizadas están marcadas con círculos para la IS6368, rombos para la IS26 y triángulos para la IS5 y sus respectivas secuencias se encuentran descritas en la tabla inferior. Las barras grises entre las parejas de plásmidos muestran regiones de >75% de identidad nucleotídica.

truncada de un *TnAs3-like*. Las dos copias de IS26 presentan la misma direccionalidad, sus secuencias flanqueantes son todas diferentes entre sí y solo presenta relación con una de las IS26 presentes en el p06-1619-NDM, lo que sugiere que pudo darse la inserción de una de una IS junto con los genes que están entre las dos copias de IS26 (Figura 12).

Plásmido p3296-NDM: este plásmido fue encontrado en el aislamiento de *P. rettgeri* de 3296, tiene un tamaño de 154,1 kb, siendo el plásmido más grande y el que presenta mayor variación entre los plásmidos NDM-positivos de este estudio. Pertenece al grupo de incompatibilidad IncT y presenta una identidad de 99,9% en el 62% de cobertura con el plásmido de *Proteus vulgaris* Rts1, esa región de alta identidad entre los dos plásmidos corresponde a un grupo grande de genes *tra* y un grupo de genes hipotéticos. En el centro del plásmido se encuentra una región variable en la que se encuentran algunos genes hipotéticos, una transposasa y una resolvasa que presentan 82% y 92% de identidad respectivamente con los genes de la *ISEc63* y corriente arriba se encuentra el gen de resistencia a betalactamasas de espectro extendido *bla*_{TEM}, el integrón clase 1 compuesto por los genes *sul1-qacED1-blaOxa-aadA1-aac(6')-Ib-cr*, las secuencias de inserción *IS6100* con secuencias flanqueantes diferentes entre sí y una *IS26* con secuencias flanqueantes que no presentan relación con ninguna otra copia de *IS26* de las analizadas en este alineamiento. Se encuentra una región que corresponde al 15% de la cobertura del plásmido la cual presenta un 99,84% de identidad con la región de virulencia y resistencia del plásmido p06-1619-NDM. A pesar de que solo presenta una copia de *IS6368*. La región conservada con el p06-1619-NDM presenta la misma organización y las secuencias flanqueantes de la *IS5* son iguales e incluso una de las secuencias flanqueantes de la *IS26* de esa región es compartida con una de la *IS26* del p06-1619-NDM. Corriente arriba se observa una copia interna del gen *repA*, adicional al que se encuentra al inicio de la secuencia plasmídica.

Este plásmido presenta la inserción de dos copias de la *ISPrre10*, flanqueando el *Tn125* truncado que inicia con un fragmento grande del gen *tat* y finaliza con el pequeño fragmento faltante de este gen, el cual esta flanqueado por la segunda copia de la *ISPrre10*. Seguido a esta estructura, están presentes los genes de los sistemas toxina-antitoxina (*parED* y *relEB*), las secuencias de inserción *IS5* e *IS26* y una copia truncada de un *TnAs3-like* (Figura 13).

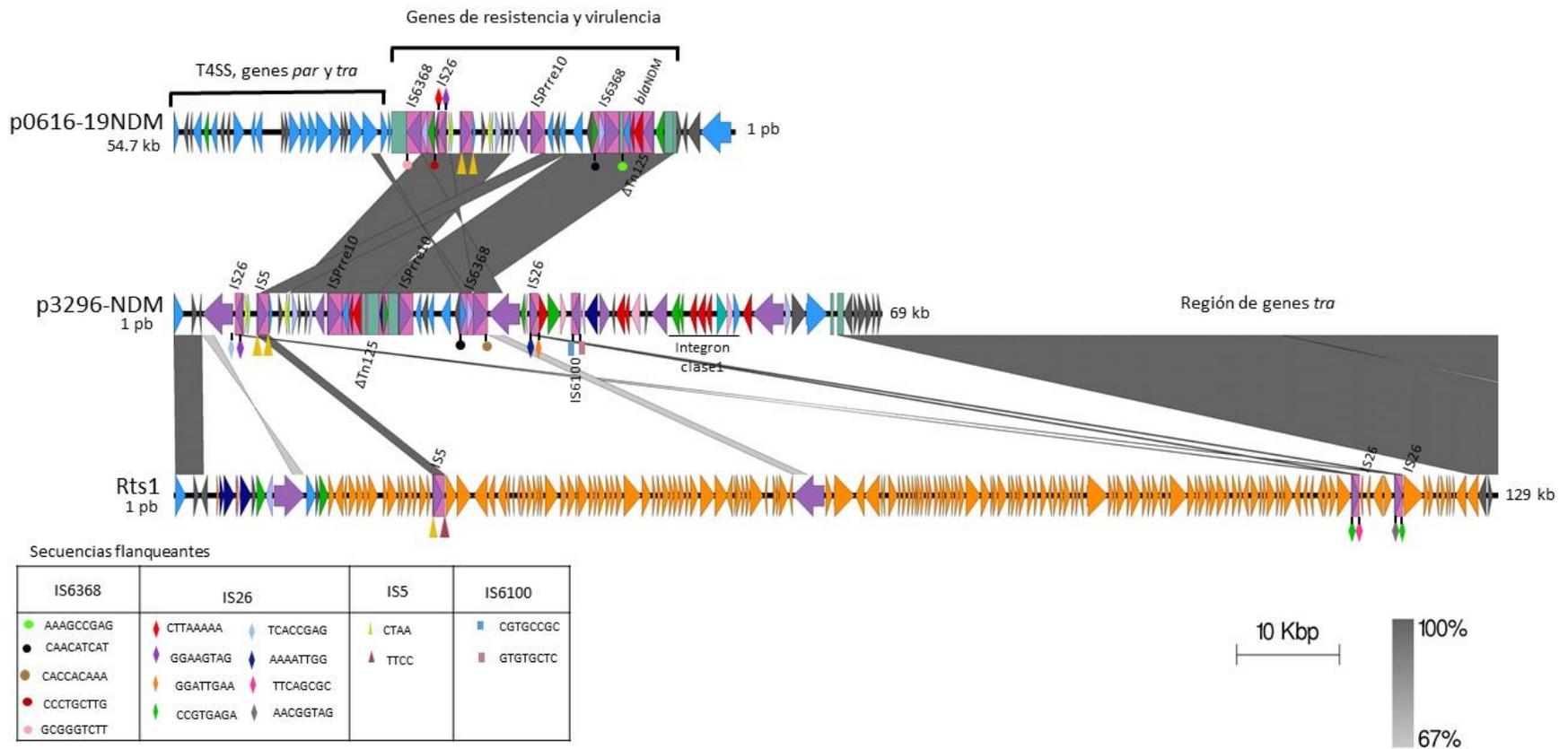


Figura 13. Comparación pareada de los plásmidos p06-1619-NDM, p3296-NDM, encontrados en *P. rettgeri* y el plásmido Rts1 de *Proteus vulgaris*. (Debido al tamaño de los dos últimos plásmidos, se muestra solamente la región variable de los mismos). Las regiones Tra-Pre, las de genes *par*, genes de resistencia y virulencia están delimitadas por líneas negras. Las secuencias flanqueantes de las ISs que fueron analizadas están marcadas con círculos para la IS6368, rombos para la IS26 y triángulos para la IS5 y sus respectivas secuencias se encuentran descritas en la tabla inferior. Las barras grises entre las parejas de plásmidos muestran regiones de >75% de identidad nucleotídica.

La comparación realizada entre el plásmido p06-1619-NDM y los plásmidos obtenidos en este estudio, permitió ver que a pesar de que estos tienen esqueletos de plásmidos reportados en aislamientos de *P. rettgeri* de diferente origen e incluso de diferente especie, para el caso del plásmido 3296-NDM, estos plásmidos presentan relación entre sí en la región del Tn 125, que en el caso del p06-1619-NDM esta truncado por la inserción de una IS6368 y corriente abajo, una segunda copia de esta IS. Las inserciones de estas dos copias forman una estructura como un transposón compuesto clase 1 en el p06-1619-NDM. Los plásmidos encontrados en este estudio conservan los genes que se encuentran en la parte interna de esta estructura y una o dos copias de la IS6368. Llama la atención que, en todos los casos, el Tn 125 se ubica en medio de estos genes y además se encuentra flanqueado por una o dos copias de la ISPrre10 (Figura 10).

Al comparar las secuencias flanqueantes de las ISs de los tres plásmidos obtenidos en este estudio se observó que las de la IS5 son idénticas en todos los plásmidos, la mayoría de las de IS26 son idénticas y en el caso de las IS6368 hay dos secuencias flanqueantes presentes en el plásmido p12105-NDM que se comparten independientemente en los otros plásmidos. Por su parte la presencia de las copias de ISPrre10 y su proximidad con el gen bla_{NDM} en todos los plásmidos, se analizó a partir de la caracterización que se hace en este estudio, tanto de la estructura, como del mecanismo de transferencia de esta nueva IS, la cual se describe a continuación.

5.4 El gen bla_{NDM-1} es movilizado por las secuencias de inserción ISPrre10 e IS6368 en *Providencia rettgeri*.

Dos hallazgos destacables se han encontrado en los tres plásmidos secuenciados en este estudio, primero, una movilización del gen bla_{NDM-1} desde afuera de la estructura de transposón compuesto Tn6368 (como es observado en el plásmido p06-1619-NDM) hacia su interior; y segundo, la movilización del gen bla_{NDM-1} hacia otras estructuras plasmídicas. Se decidió profundizar en los mecanismos moleculares involucrados en estas movilizaciones. Los tres plásmidos secuenciados mostraron la inserción de una transposasa putativa flanqueando un fragmento del Tn 125 que alberga el gen bla_{NDM-1} . Una comparación contra las secuencias reportadas en la base datos del ISfinder mostró un porcentaje de identidad del 54% respecto a la secuencia ISVa3, perteneciente a la familia

IS91. Esta nueva secuencia se registró en esta base de datos y el código asignado fue *ISPrre10*. Las IS que conforman la familia IS91 presentan características diferentes a las de otras familias; contienen secuencias terminales diferentes y su transposición es en forma de círculo rodante y sitio-específica, generándose siempre después de las secuencias CTTG o GTTC (88), tras lo cual la IRR queda adyacente al extremo 3' de la secuencia blanco sin generar duplicaciones del ADN objetivo (Figura 13). Este extremo de la secuencia se ha demostrado que es imprescindible para la transposición y es llamada *oriIS* (88, 89). La secuencia terminal a diferencia de otras IS no es una secuencia repetida de la IRR, en la familia IS91 se trata de una secuencia llamada *terIS* que tiene un papel en el reconocimiento del punto de terminación en eventos de transposición, pero no es imprescindible (89). Estas secuencias terminales se buscaron en la región adyacente a la transposasa de la *ISPrre10* (en todas las copias encontradas en los plásmidos de este estudio) y se realizó un alineamiento con las secuencias *oriIS* y *terIS* de las IS91 y de la *ISVa3* cuya transposasa es la que mayor identidad tiene con la TnpA de *ISPrre10* (54,25% en el 99% de la cobertura). Como resultado se observó que la *ISPrre10*, presenta las mismas características conservadas para la mayoría de las secuencias de inserción de la familia IS91, por lo que fue posible establecer su secuencia completa tal como se muestra en la figura 13 y hacer el registro en la base de datos de ISFinder, a partir de lo cual se asignó el código registrado en este estudio.

Como se mencionó anteriormente, en la familia IS91 las secuencias terminales tienen un papel importante en eventos de transposición, ya que esta familia presenta un modelo de replicación por círculo rodante (CR), se ha descrito que la formación de estructuras secundarias en la secuencia *oriIS* favorece el inicio la formación de la horquilla necesaria para el inicio del proceso de transposición y por su parte la secuencia de *terIS* es importante para el reconocimiento del final de la transposición. Se ha demostrado que cuando se prescinde de esta secuencia o no hay un reconocimiento adecuado de la misma, la transposición se da con fragmentos de ADN adicionales a la IS, adyacentes a *terIS* (88, 89).

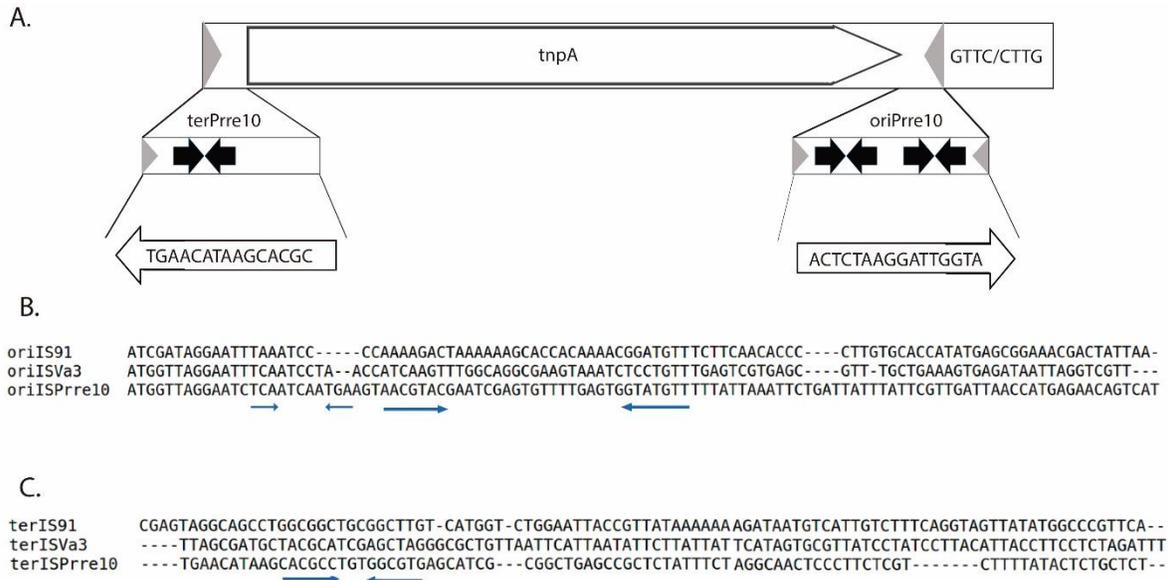


Figura 14. Estructura genética de *ISPrre10* A. Representación de la *ISPrre10* completa, en la parte superior se representa la transposasa (*tnpA*) flanqueada por las secuencias terminales señaladas por las puntas de flecha grises y las secuencias CTTG o GTTC usadas como blanco por la IS, que siempre están adyacentes a esta. En la parte central están representadas las secuencias *ter* y *ori*, las flechas negras gruesas representan pequeñas repeticiones invertidas de la secuencia consideradas funcionalmente importantes. Las flechas en la parte inferior representan la parte final de las secuencias. B y C. Comparación de las secuencias terminales de *IS91*, *IS801* e *ISPrre10*. Las flechas horizontales indican las zonas de las pequeñas repeticiones invertidas.

Teniendo en cuenta esta información, en este estudio se usaron programas para predecir la formación de estructuras secundarias tanto en *oriIS* como en *terIS* y adicionalmente en una secuencia *ter2* propuesta en este estudio para la *ISPrre10*, que se ajusta con lo reportado en experimentos de transposición de *IS91* descritos por Bernales y colaboradores en 1999 (89). Las estructuras secundarias mostradas en la figura 15 se eligieron haciendo un consenso de aquellas que se conservaban en la mayoría de modelos propuestos, usando la opción para secuencias de ADN de las herramientas RNAstructure tools, disponible en <https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/> y RNAfold Websrver, disponible en <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi> (90). Adicionalmente, la ubicación de los puntos de formación de estas estructuras está señalada con flechas delgadas horizontales en la figura 14.

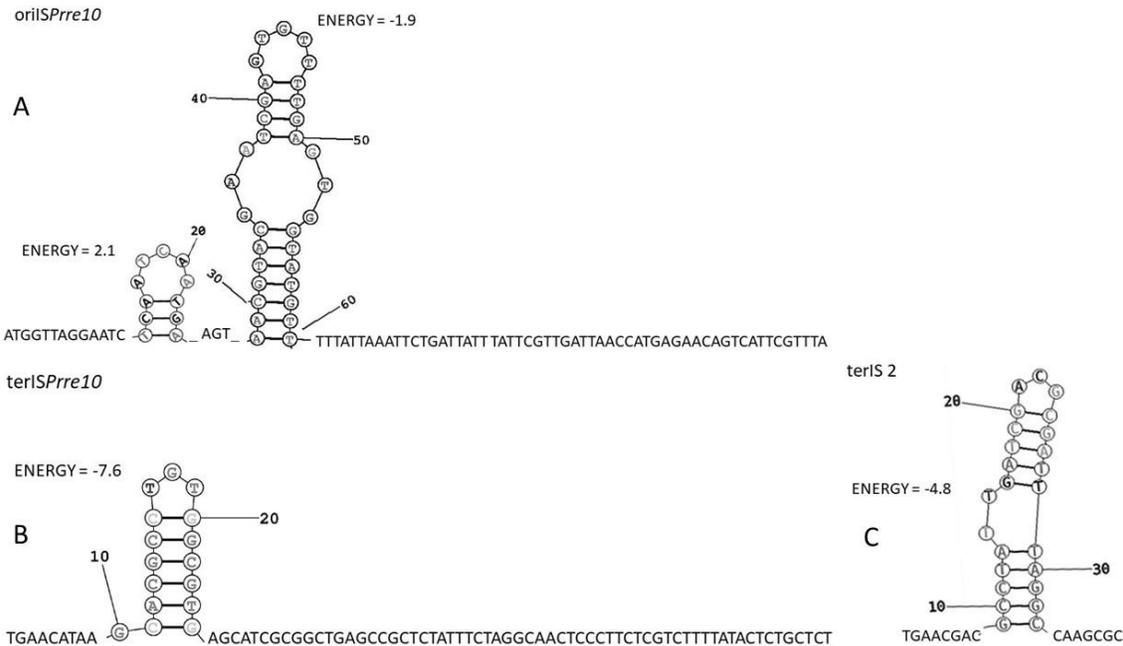


Figura 15. Estructura y secuencia de las regiones oriIS y terIS. Se ilustran las estructuras secundarias propuestas para las regiones oriISPrr10 (A), terISPrr10 (B) y un posible ter2 en *Δtat* (C). Se muestra la predicción de las estructuras secundarias que se podrían formar y la energía requerida para que se forme cada estructura. Se señala la posición de algunas bases que forman cada estructura propuesta.

Adicionalmente se identificaron en *ISPrr10* los motivos conservados descritos para la familia IS91, a partir de un alineamiento con secuencias de transposasas que ya han reportado los 5 dominios conservados para esta familia y se adiciono la ISVa3 por la identidad que presenta con la *ISPrr10*. Se emplearon 8 secuencias de transposasas tal como se describe por Garcillan en el 2002 (88). Los resultados de este alineamiento muestran la conservación y el consenso de los residuos de aminoácido en cada posición del dominio a lo largo de las 8 secuencias comparadas (Figura 16), y permiten confirmar que la *ISPrr10* no solo presenta la estructura genética característica de la familia IS91, además, como se ve en la figura 16, su transposasa cuenta con los 5 residuos conservados de la familia y presenta los residuos de aminoácido que se han descrito como necesarios para la actividad de la enzima y su acción en la replicación de tipo CR (89). Estos residuos están en el motivo 3, que es el más conservado y que por lo tanto se considera como una marca que define a esta la familia. Las tres histidinas de este motivo junto con los dos residuos conservados de tirosina en el motivo 4 (resaltados en la figura 16 en color azul aguamarina), forman el centro catalítico de la proteína, específicamente, los residuos de tirosina del motivo 4 están directamente implicados en catalizar el clivaje inicial y la reacción de transferencia de la cadena de ADN (89). Esto sugiere que la *ISPrr10* cuenta con las

características necesarias para ser un EGM activo con la facultad de moverse y generar cambios en las moléculas de ADN que la albergan.

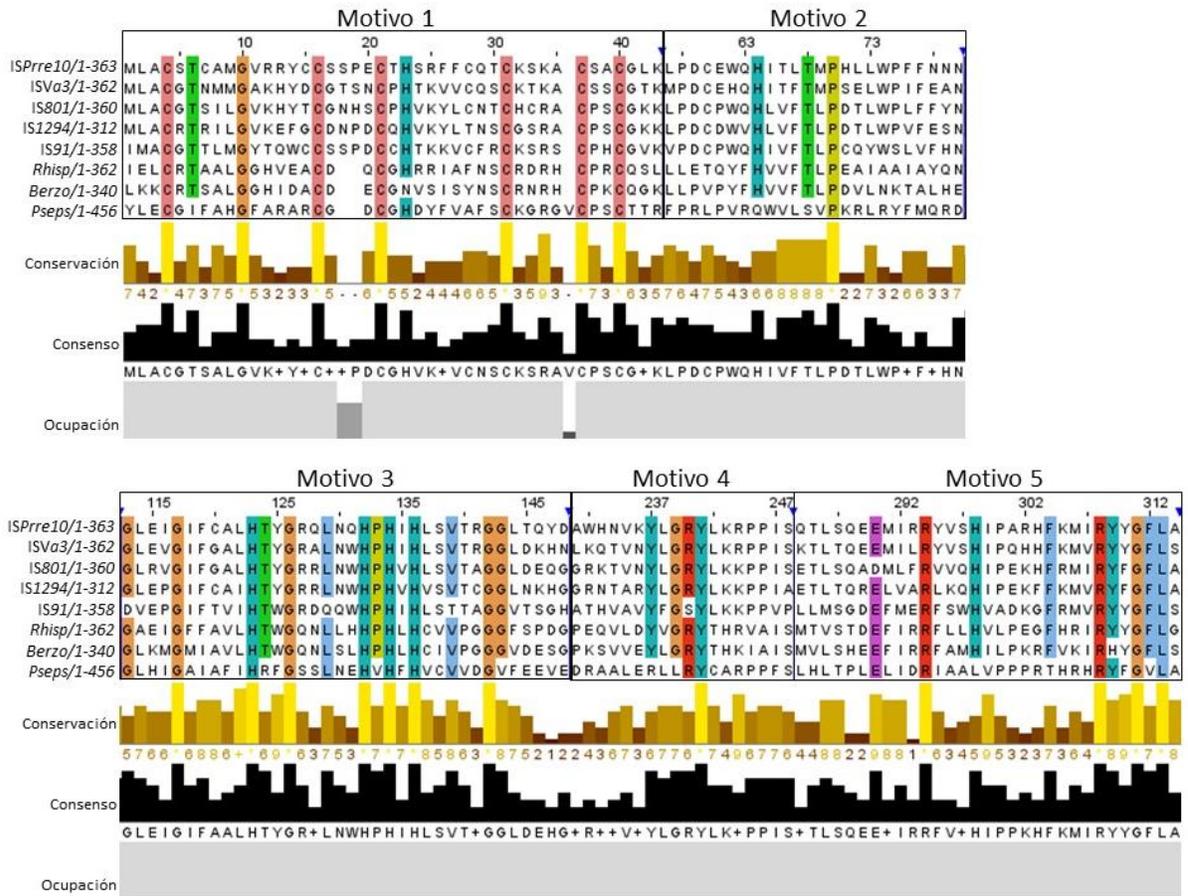


Figura 16. Alineamiento de transposasas IS91-like. La figura muestra las secuencias de aminoácidos de 8 transposasas IS91-like únicamente de la región correspondiente a los 5 motivos conservados, las cuales comparten el mecanismo de replicación por círculo rodante (CR). Los residuos conservados se resaltan con colores diferentes para cada residuo. El nivel de conservación de cada residuo en las secuencias, se ve reflejado en la gráfica de la parte inferior. El consenso del residuo en cada posición del motivo se observa en la gráfica de barras de la parte inferior. Cada motivo está delimitado por un recuadro negro. Las secuencias fueron alineadas usando el programa MAFF alignment (91) y visualizado en el programa Jalview (92). Las secuencias usadas están referenciadas en el trabajo de Bernales y colaboradores en el 2002 (89).

Conociendo la estructura y mecanismo de movilización de la *ISPrre10* se realizó un análisis del entorno de estos EGM. Teniendo en cuenta que, en los plásmidos encontrados en este estudio, las copias de *ISPrre10* están adyacentes al $\Delta Tn125$ y en el caso del p06-1619-NDM la única copia se encuentra corriente abajo de la primera IS6368, se hizo una búsqueda de las secuencias blanco CTTG y GTTC en estos entornos. Adicionalmente se hizo una búsqueda de regiones que tengan la misma secuencia presente en *terISPrre10* y que puedan funcionar como puntos de reconocimiento de terminación de la transposición

(ter2) en el $\Delta Tn125$ y en la estructura formada entre las copias de IS6368 con el fin de identificar posibles eventos de movilización que involucren a ISPrre10 y a los otros EGM presentes en el entorno del gen *bla_{NDM}*.

5.5 Plataformas de movilización del gen *bla_{NDM}* en aislamientos de *P. rettgeri* de un hospital de México.

A partir del análisis detallado de las secuencias de los plásmidos encontrados en este estudio, se identificaron muchos puntos en el $\Delta Tn125$ que pueden ser detectados por ISPrre10 como secuencia objetivo, pero llamó la atención la secuencia CTTG encontrada corriente arriba de la primera copia de ISPrre10 en el plásmido p12105-NDM, la cual esta adyacente a un fragmento del gen truncado *tat*. Esta pudo servir como secuencia objetivo en el $\Delta Tn125$ de una secuencia hipotética generada tras una inversión del Tn125 (paso 1 y 2 de la figura 17). Teniendo en cuenta que se han reportado eventos de transferencia en los que la IS91 moviliza ADN corriente abajo de terS (89), se realizó la búsqueda de una secuencia de terminación que permitiera este tipo de evento y resultó en la identificación de la secuencia GTTCA en el fragmento pequeño del gen truncado *tat*. Esta secuencia se propone en este estudio como ter2, por lo que se realizó la predicción de una estructura secundaria (Figura 15). Este resultado sugiere que podría funcionar como secuencia de terminación de ISPrre10 en un evento de transposición que pudo haber movilizado el remanente del $\Delta Tn125$ en una región del plásmido con una copia previa de ISPrre10 tal como se muestra en el paso 4 de la figura 17, generando la estructura observada en el plásmido p12105-NDM.

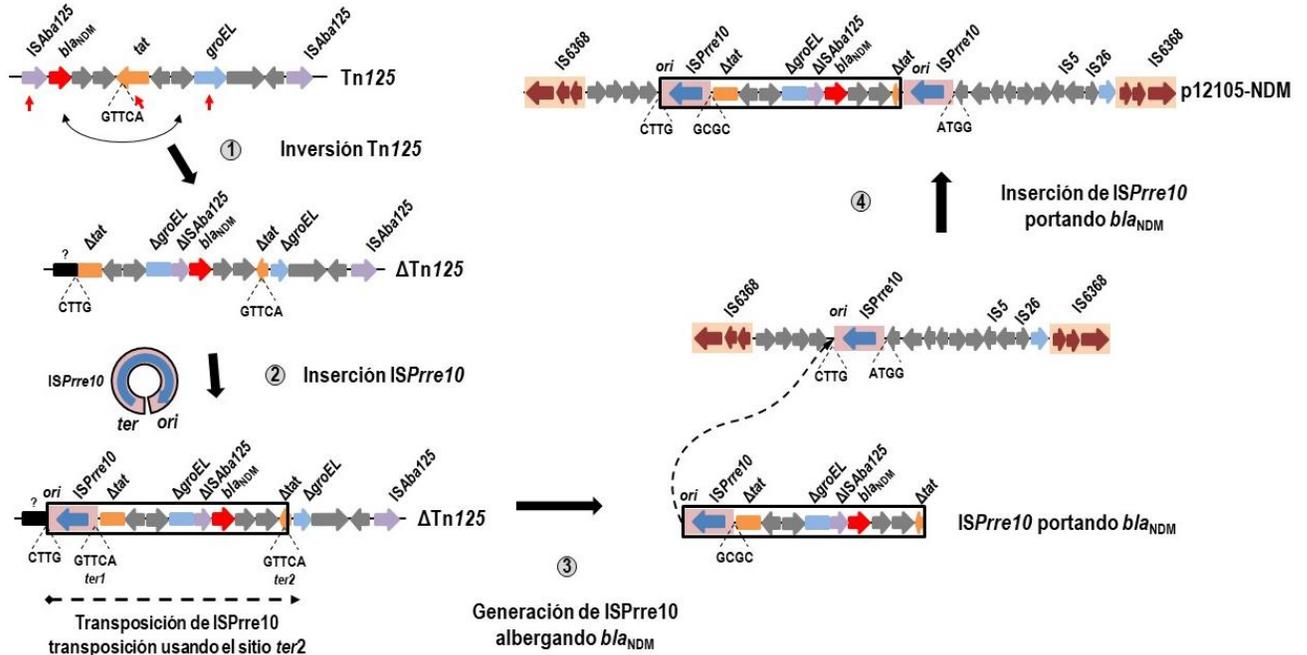


Figura 17. Movilización del gen *bla_{NDM}* por medio de la transposición de *ISPrre10*. Se muestra la estructura del Tn125 las flechas rojas señalan los puntos en los que se genera el cambio de la secuencia tras un proceso de inversión, las secuencias que se muestran en medio de las líneas punteadas son la secuencia blanco de *oriPrre10* y la secuencia de terminación *terPrre10*. El recuadro negro señala el fragmento de la secuencia que es movilizado y la flecha punteada indica la ubicación a la que se moviliza dicho fragmento.

Teniendo en cuenta el resultado anterior, se analizó la secuencia del plásmido p3296-NDM, en este caso se propone un modelo de movilización que parte de una secuencia de ADN con dos copias de la IS6368 en un plásmido, formando una estructura como un transposón compuesto. En este caso la movilización de este fragmento en el que se encuentra el Δ Tn125, se da por la formación de una unidad translocativa UT6368 que se inserta corriente arriba de un gen de transposasa en un plásmido con el esqueleto del Rts1. La secuencia flanqueante derecha de la IS6368 que se moviliza se mantiene igual después de la inserción, pero se observa un cambio en la direccionalidad de los genes de la estructura movilizada al compararla con la secuencia observada en el p12105-NDM, sin embargo mantiene la estructura interna señalada en el recuadro de la parte superior de la figura 18 y pierde una copia de IS6368.

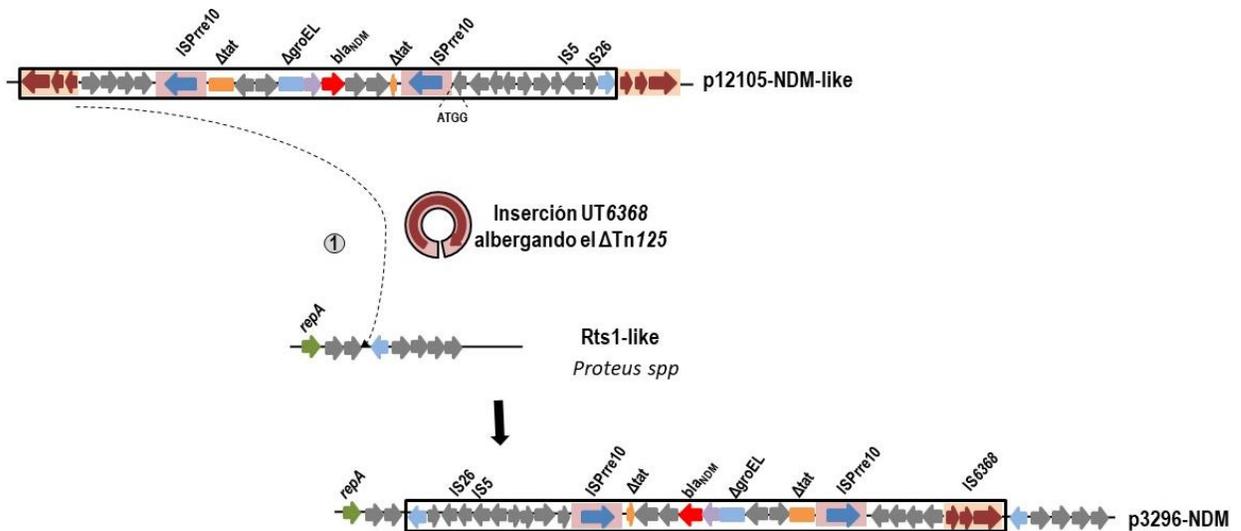


Figura 18. Modelo de movilización del gen *bla_{NDM}* propuesto para el plásmido p3296-NDM. En la parte superior se muestra la secuencia hipotética p12105-like, la flecha punteada indica la movilización del fragmento de la secuencia que se encuentra en el recuadro, la cual se da a partir de la IS6368 señalada y se inserta en la ubicación señalada al final de la flecha.

En el caso del plásmido p12100-NDM se propone un modelo de movilización del $\Delta Tn125$ partiendo de una secuencia de ADN hipotética p12105-NDM-like. En este caso se tuvo en cuenta la direccionalidad de los EGM, su ubicación con respecto al $\Delta Tn125$ y la presencia de secuencias flanqueantes compartidas de la IS26 e IS6368. Se sugiere una movilización de varios pasos, iniciando con la formación de una unidad translocativa UT6368 que moviliza la estructura señalada en el recuadro superior de la figura 19, la cual alberga el $\Delta Tn125$. La presencia de la secuencia flanqueante interna de la IS6368 sugiere que fue esta copia la que generó la UT. Esta UT6368 se inserta en la secuencia hipotética p06-1619-1-like corriente arriba de una copia preexistente de la IS6368. Posteriormente en el paso 2, se propone la inserción de una copia de IS6368 en el fragmento de la transposasa troncada de la IS*Aba125*, justo donde se señala con la flecha roja, quedando la secuencia señalada en el tercer recuadro, por lo que se perdería la secuencia corriente abajo de esta inserción (parte del $\Delta Tn125$, una copia se IS*Prre10* y el gen *repA*). En un tercer paso se propone la inserción de una UT26 que moviliza un pequeño grupo de genes, la cual se inserta justo donde termina la IS26 que se encontraba previamente en el plásmido (Figura 19).

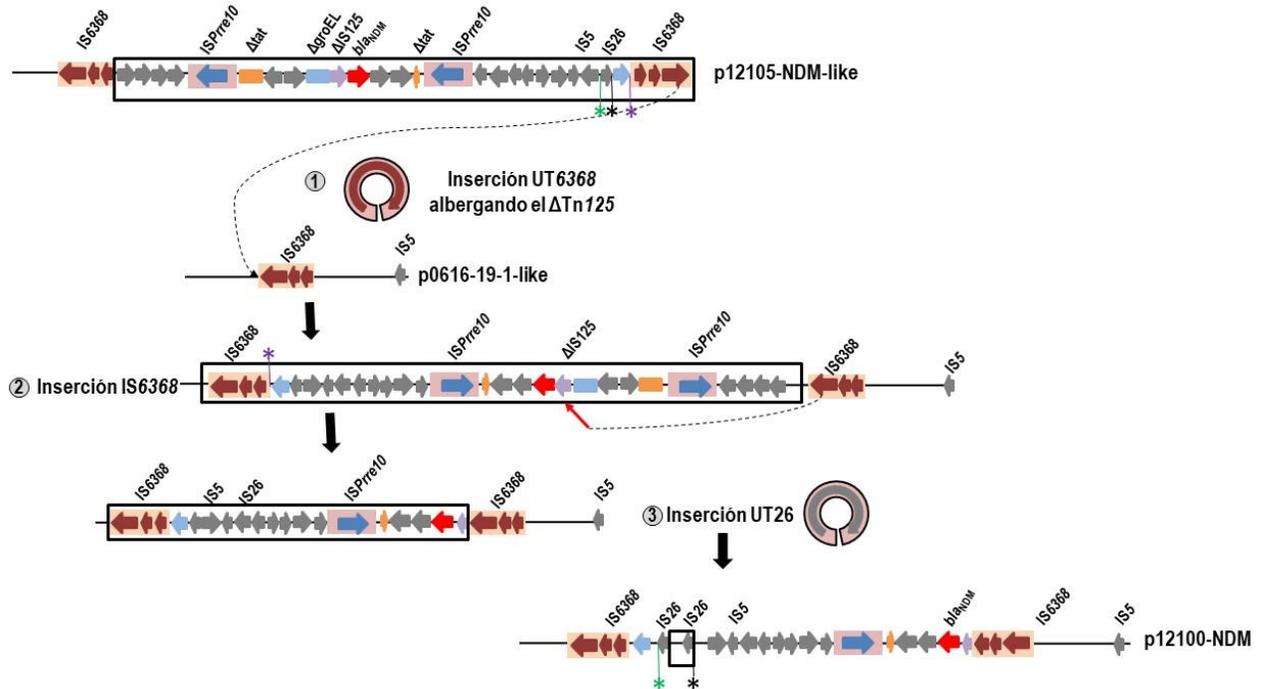


Figura 19. Modelo de movilización del gen *bla_{NDM}* propuesto para el plásmido p12100-NDM. En la parte superior se muestra en el recuadro el fragmento de la secuencia que se moviliza a partir de un plásmido hipotético con estructura similar a la de p12105-NDM. Las flechas punteadas indican la secuencia que se moviliza y la ubicación en la que lo hace. Los asteriscos de colores indican secuencias flanqueantes compartidas en verde y negro las de la IS26 y en lila la de la IS6368.

En resumen, el análisis de los EGM presentes en el entorno del gen *bla_{NDM}* permite sugerir que la movilización de este gen de resistencia se dio inicialmente por movilización del Tn 125 hacia otro plásmido en el que se dio la inserción de dos copias de la IS6368 que movilizó los genes de los sistemas toxina- antitoxina (*parED* y *relEB*) y truncó el Tn125. En la figura 19 la secuencia conformada por las dos copias de IS6368 se ha etiquetado como Tn6368 ya que forma una estructura como transposón compuesto clase 1. En la figura 19 se ve también que el gen *bla_{NDM}* se mantiene en el Δ Tn 125 y este a su vez puede sufrir cambios por posibles inversiones en su estructura y posteriormente ser movilizado por ISPrre10 con su mecanismo de transposición de círculo rodante. Se puede ver que a medida que se dan las movilizaciones del Δ Tn 125 entre plásmidos, se van generando modificaciones de su entorno relacionado con la organización de la estructura conformada por copias de la IS6368, la cual a su vez también funciona como EGM capaz de movilizar al gen *bla_{NDM}* a través de la formación de unidades translocativas tal como se ve en la figura 20.

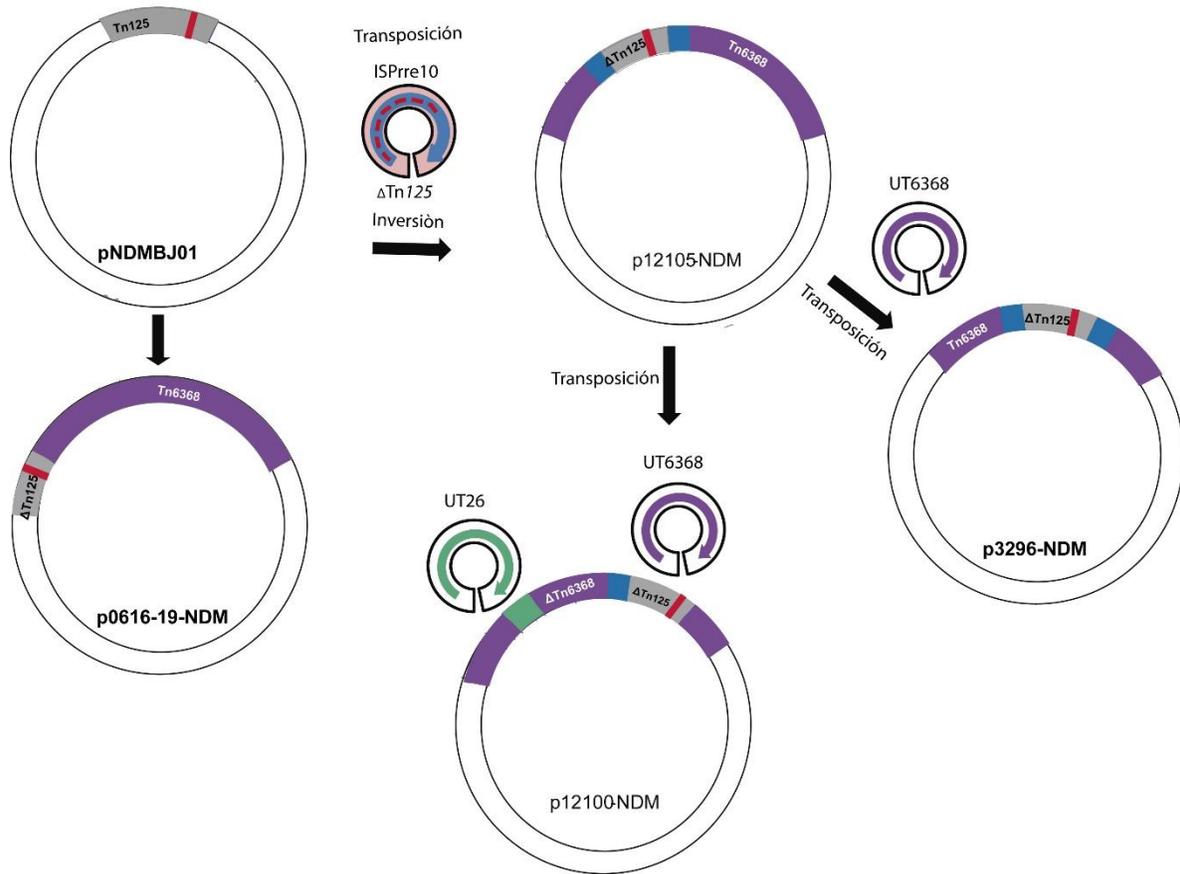


Figura 20. Modelo propuesto de movilización del gen *bla*_{NDM} entre los plásmidos encontrado en este estudio y los antecedentes propuestos por Márquez y colaboradores en el 2017, partiendo del plásmido pNDMBJ01. En cada plásmido están representados los EGMs con participación en la movilización de gen de resistencia o modificaciones en el entorno. Los arcos color gris representan el Tn125 en el pNDMBJ01 y Δ Tn125 en los demás, los arcos color morado representan la estructura a manera de transposón compuesto formada por las IS6368 o su remanente, en azul se representa las copias de ISPre10 y en verde la IS26. Los círculos pequeños entre los plásmidos con flechas del mismo color de los EGM representan el mecanismo propuesto como responsable de la movilización del gen *bla*_{NDM} o de la inserción de un grupo de genes para el caso de la IS26.

6 DISCUSIÓN

La amplia dispersión de la metalo- β -lactamasa de Nueva Delhi (NDM) entre enterobacterias, está generando problemas en los sistemas de salud a nivel mundial, ya que esta enzima tiene la capacidad de hidrolizar a la mayoría de los β -lactámicos, incluyendo los carbapenémicos, lo cual limita las opciones de tratamiento. Aunque se considera que el gen *bla*_{NDM} se originó en *Acinetobacter*, aún no es claro cómo fue su transferencia a *Enterobacterales* en donde ha tenido mayor impacto y a la que pertenece *P. rettgeri*.

En el 2017, a partir de un aislamiento clínico de *P. rettgeri* de un hospital de México, se reportó el plásmido p06-1619-NDM, una variante del plásmido pNDM-BJ01-like, propio de *Acinetobacter spp* (17) e interesantemente, dicho plásmido presentó mayor estabilidad en *P. rettgeri*, sugiriendo que esta enterobacteria podría tener un papel clave en la diseminación del gen *bla*_{NDM}. Con el fin de entender el papel de *P. rettgeri* en la diseminación y movilización del gen *bla*_{NDM} desde *Acinetobacter* a las distintas especies de enterobacterias, en este estudio se analizaron 19 nuevos aislamientos de *P. rettgeri* portadores del gen *bla*_{NDM} y se pudo determinar la circulación de diferentes clones de *P. rettgeri* en la institución, los cuales presentan diferencias genéticas asociadas al Tn 125 en el que se encuentra el gen *bla*_{NDM}.

A partir de la secuenciación del genoma completo de 6 aislamientos, se obtuvieron resultados novedosos e interesantes. El primer resultado novedoso, es que en los aislamientos que fueron secuenciados se encontró la presencia de tres plásmidos (p12105-NDM, p12100-NDM y p3296-NDM) los cuales no habían sido reportados previamente, pero que presentan esqueletos de plásmidos previamente identificados en enterobacterias y llamó la atención que conservan la región de virulencia y resistencia del plásmido p06-1619-NDM (17). Los plásmidos reportados en este estudio conservan en su estructura elementos que son propios de p06-1619-NDM tales como: las copias de la IS6368 que forman una estructura como un transposón compuesto clase 1, dentro de la cual se encuentran los genes que codifican para dos sistemas toxina-antitoxina *parED* y *relEB* que pueden estar relacionados con la estabilidad plasmídica, lo que pudo haber favorecido la permanencia del p06-1619-NDM en *P. rettgeri*, tal como ha sido reportado para otros modelos (93).

Un segundo resultado, que es fundamental y que aporta nuevo conocimiento para entender cómo ocurre la dispersión del gen *bla*_{NDM} a otras enterobacterias de gran impacto clínico fue la determinación de nuevas plataformas de movilización del gen *bla*_{NDM}. Entre estas plataformas identificadas, se encuentra una nueva secuencia de inserción registrada en este estudio en la base de datos ISFinder (87) con el código *ISPrre10*. Los análisis bioinformáticos, mostraron que esta secuencia pertenece a la familia IS91. Esta familia de IS se caracteriza por movilizarse usando un mecanismo de círculo rodante (88, 89), por lo que se analizó la estructura de los posibles sitios blanco de las copias de *ISPrre10* presentes en los plásmidos de estudio. Pudimos establecer que la *ISPrre10* efectivamente cuenta con la región de reconocimiento sitio específico *oriISPrre10*, y la secuencia de terminación *terISPrre10* y adicionalmente se identificó en el Tn 125 una secuencia definida en este estudio como *ter2*, que de acuerdo a los detalles específicos de la región, se sugiere que pudo funcionar como secuencia de terminación en un evento de transposición de *ISPrre10*, co-movilizando el remanente del Δ Tn125 por medio de un mecanismo de transposición de círculo rodante.

A pesar de ser una IS nueva, los resultados de la comparación hecha con la base de datos de nucleótidos del NCBI mostró que existen secuencias similares que han sido reportadas en diferentes especies de la Tribu *Proteeae* y *Klebsiella spp*, lo que sugiere que la *ISPrre10* podría tener éxito movilizándolo el gen *bla*_{NDM} en esas bacterias, entre las cuales se encuentran enterobacterias de gran impacto clínico como *K. pneumoniae* (número de acceso PRJNA259791) (94). Por otro lado, la IS6368 que había sido previamente descrita en el plásmido p06-1619-NDM, también se reporta en este estudio, como una nueva plataforma de movilización del gen *bla*_{NDM}, que adicionalmente también moviliza los genes de los sistemas toxina-antitoxina *parED* y *reIEB* los cuales podrían estar involucrados en la estabilidad plasmídica (95-97), por lo tanto, se sugiere que en *P. rettgeri* también podrían tener un papel fundamental en la estabilidad de los plásmidos portadores del gen *bla*_{NDM}. Adicionalmente se encontró que la IS26, la cual es muy frecuente en diversas especies bacterianas (98, 99) está movilizándolo genes en el entorno genético de *bla*_{NDM} en *P. rettgeri*.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que las nuevas plataformas y mecanismos de movilización de *bla*_{NDM} asociados a diversos EGM ya reportados como Tn 125, Tn3000, *ISVsa3*, *UT6368-like*, *ISPrre10* (59, 66) pueden favorecer la diseminación del gen *bla*_{NDM} a

otros plásmidos e incluso al cromosoma, como se pudo ver en resultados preliminares que aún no han sido publicados por el LGMB y que sugieren, que posiblemente la IS *Vsa3* puede tener un papel importante en la movilización de *bla_{NDM}* al cromosoma, estabilizando el mecanismo de resistencia en la especie. Previamente en el estudio de Márquez y colaboradores del 2017, se sugirió que el gen *bla_{NDM}* puede seguir un modelo de muñeca rusa como se ve en los plásmidos encontrados en este estudio, este modelo indica que genes de resistencia pueden alojarse en unidades transmisibles anidadas, como se ha visto en el gen *bla_{NDM}* (17, 100) y como se describe a continuación.

El gen *bla_{NDM}*, se ubica en el Tn125, tal como ha sido reportado frecuentemente en enterobacterias (59, 101), en este estudio, observamos que también se encuentra truncado (Δ Tn125). Nosotros planteamos que el Δ Tn125 puede estar movilizándose entre las copias de la nueva IS *Prre10*. Estas copias a su vez se encuentran entre dos copias de IS6368, que también tienen capacidad de movilizar no sólo al Δ Tn125, sino también a los genes de los sistemas toxina-antitoxina. A su vez estas IS se encuentran dentro de plásmidos a partir de los cuales se pueden dar otros eventos de movilización y ser transferidos a otras bacterias.

Teniendo en cuenta estos elementos, se propone el modelo de diseminación de la figura 21, en la cual se plantean una serie de eventos independientes de movilización de plásmidos entre diferentes enterobacterias como *Proteus spp.* los cuales tienen como punto en común a *P. rettgeri*, tal como fue sugerido por Márquez y Col, 2017. De hecho, este estudio nos permite reforzar la hipótesis planteada por estos autores del papel central que tiene *P. rettgeri* en la diseminación del gen *bla_{NDM}* desde *Acinetobacter* a enterobacterias (17).

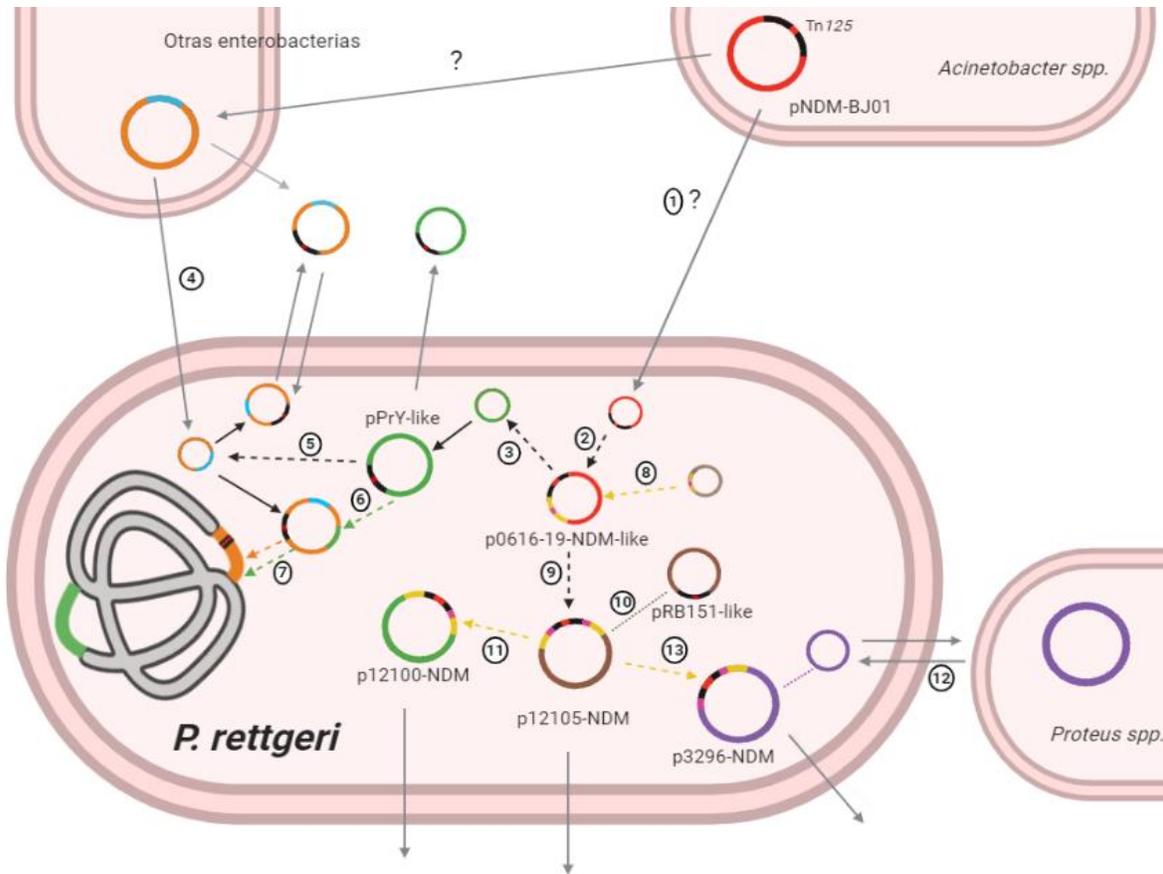


Figura 21. Modelo de diseminación del gen *bla_{NDM}* con *P. rettgeri* jugando un papel importante en la diseminación. Inicia con un posible evento en el que un plásmido de *Acinetobacter spp.* pNDM-BJ01-like con el Tn125 completo, se moviliza hacia una *P. rettgeri* (1) Estando en esta bacteria comienza a presentar modificaciones en el Tn125 (negro). (2) posteriormente este transposón se transfiere a un plásmido de circulación en *P. rettgeri* como pPrY-like (3). Diversos plásmidos de otras enterobacterias pueden ingresar a *P. rettgeri* (4) El gen *bla_{NDM}* estando en el plásmido de la enterobacteria *P. rettgeri*, puede transferirse a plásmidos de otras enterobacterias como *Klebsiella spp* por medio de diferentes EGMs de alta movilización como IS26 (5). Estos plásmidos de enterobacterias ya con el gen *bla_{NDM}*, pueden moverse hacia otras bacterias, diseminando el gen o seguir interactuando en *P. rettgeri* en donde pueden sufrir otras modificaciones (6). De acuerdo con datos aun no publicados de análisis que hemos hecho en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana, se sabe que *bla_{NDM}* puede moverse al cromosoma junto con fragmentos de la molécula en la que se encuentra (verde y naranja) posiblemente por medio de EGMs como ISVsa3, que presenta un mecanismo de replicación por CR (7). Por otro lado, se sugiere la movilización de IS6368 (amarillo) y de ISPrre10 (rosado) a partir de un plásmido hipotético (gris), hacia el plásmido p06-1619-NDM-like (8). A partir de plásmidos p06-1619-NDM-like, se pueden dar diferentes eventos de modificación del entorno del gen *bla_{NDM}* que involucre a los EGM como IS6368 e ISPrre10. El siguiente evento en este modelo, se da por la acción de ISPrre10 movilizándolo el Δ Tn125 en medio de una estructura a manera de transposón compuesto clase 1, formada por 2 copias de IS6368 (9). Posteriormente hay una transferencia de toda esta región hacia otros plásmidos con esqueletos ya reportados en *P. rettgeri* como pRB151-NDM-like (café) (10). La interacción de plásmidos p1205-NDM-like con otros plásmidos que tienen la maquinaria de transposición Tra-Pre, permite que el gen *bla_{NDM}* sea transferido por medio de UT6368 a plásmidos con capacidad de conjugación que circulan en *P. rettgeri* (11). Se da el ingreso de plásmidos de diferentes enterobacterias como *Proteus spp.* (morado) a *P. rettgeri* (12) El siguiente evento es la transferencia por UT6368 del Δ Tn125 junto con otros EGM como ISPrre10 y los genes de los sistemas toxina-antitoxina (asociado con estabilidad plasmídica), hacia un plásmido con circulación entre *Proteus spp.* (13). El conjunto de eventos y de hallazgos descritos en este modelo, permiten sugerir que el gen *bla_{NDM}* puede tener un mayor potencial de diseminación entre las diferentes especies de enterobacterias.

Se postula que *P. rettgeri* puede estar funcionando como un puente que permite la movilización del gen *bla_{NDM}* por un EGM como *ISPrre10* desde un plásmido de *A. baumannii* (p06-1619-NDM) hacia plásmidos de *P. rettgeri*. Posteriormente, en esta bacteria elementos genéticos como IS6368 pueden formar unidades transponibles a manera de transposón compuesto en la que se alojan genes que codifican para los sistemas de muerte post-segregacional, los cuales facilitan el mantenimiento del gen en la bacteria para su posterior diseminación en plásmidos conjugativos, desde los cuales se da la transferencia a otras enterobacterias de alto impacto clínico.

El fenómeno descrito anteriormente también ha sido observado en el modelo propuesto para la diseminación de genes como *bla_{CTX-M}* (102). De manera similar a lo que se está observando en *P. rettgeri*, se ha demostrado que es posible que en bacterias de bajo impacto clínico como *Kluyvera spp* se haya dado una serie de eventos independientes en un modelo jerárquico que involucra varios elementos genéticos en la movilización, mantenimiento y diseminación del gen *bla_{CTX-M}*, tal como se describe a continuación. Se ha planteado que el gen *bla_{CTX-M}* pudo haberse movilizado desde el cromosoma de *Kluyvera spp* por la acción de EGM identificados en plásmidos de diferentes bacterias; corriente arriba del gen *bla_{CTX-M}*, se ha identificado la secuencia de inserción *ISEcp*, la cual actúa como elemento de movilización del gen. También se ha encontrado adyacente, una región CR1, la cual contiene un integrón clase 1, asociado con el mantenimiento de las unidades transponibles que se forman y se incorporan a plásmidos conjugativos. A partir de estos plásmidos, se da la diseminación a enterobacterias de alto impacto clínico, las cuales incorporan así, estas estrategias de captura de genes de resistencia (101-104).

Tomados en conjunto, los resultados nuevos que se presentan en este trabajo y los reportados previamente, nos permiten sugerir que *P. rettgeri* actúa como un reservorio para la diseminación del gen *bla_{NDM}* mediante nuevas plataformas que promueven su movilización y dispersión a otras enterobacterias de mayor impacto clínico, lo cual nos lleva a proponer a *P. rettgeri* como un modelo para estudiar fenómenos como estabilidad plasmídica y movilización de genes por EGM con diferentes mecanismos de acción.

7 CONCLUSIONES

- En la institución mexicana existió la circulación de diferentes clones de *Providencia rettgeri* portadores del gen *bla_{NDM}*, relacionados con aislamientos previamente reportados en otros países y con entornos genéticos de movilización diferentes.
- El análisis genómico comparativo de los tres nuevos plásmidos de *Providencia rettgeri* que portan el gen *bla_{NDM}*, brindó mayor evidencia de la movilización de *bla_{NDM}* a otras estructuras plasmídicas previamente reportadas en *P. rettgeri* y otras especies de enterobacterias, posiblemente mediante la nueva secuencia de inserción *ISPrre10* y las unidades translocativas asociadas a la *IS6368*.
- La inclusión de los genes de los sistemas toxina-antitoxina *parED* y *relEB* por medio de unidades translocativas sumado a la presencia del gen de resistencia *bla_{NDM}* podría brindar en las bacterias ventajas adaptativas más estables que puedan promover la permanencia del mecanismo de resistencia en la especie.

8 RECOMENDACIONES

- Teniendo en cuenta los eventos de movilización que se han reportado en *P. rettgeri* y el modelo de diseminación expuesto en este estudio, se propone a la especie *P. rettgeri* como modelo de estudio para analizar los mecanismos de movilización del gen *bla_{NDM}*.
- La caracterización por primera vez de la *ISPrre10* sugiere un nuevo mecanismo de movilización del gen *bla_{NDM}*. Por lo tanto, se recomienda que se realice un estudio empleando diferentes plásmidos y que se estudie el papel que pueda tener este mecanismo en la movilización no sólo de *bla_{NDM}* sino también de otros genes de resistencia en *P. rettgeri* y en otras especies bacterianas. Por esto sería interesante demostrar experimentalmente la co-movilización de genes mediados por transposición de tipo círculo rodante y la participación de secuencias de reconocimiento *ter2* en eventos de movilización de secuencias de ADN flanqueadas por la *ISPrre10*.
- Es necesario continuar con el estudio de las Unidades translocativas asociadas a la *IS6368* para tener mayor evidencia experimental del proceso de movilización de *bla_{NDM}* con sistemas de muerte post-segregacional.

9 BIBLIOGRAFIA

1. Watkins RR, Bonomo RA. Overview: Global and Local Impact of Antibiotic Resistance. *Infectious disease clinics of North America*. 2016;30(2):313-22.
2. Zilberberg MD, Nathanson BH, Sulham K, Fan W, Shorr AF. Carbapenem resistance, inappropriate empiric treatment and outcomes among patients hospitalized with Enterobacteriaceae urinary tract infection, pneumonia and sepsis. *BMC infectious diseases*. 2017;17(1):279.
3. Lemos EV, de la Hoz FP, Alvis N, Einarson TR, Quevedo E, Castaneda C, et al. Impact of carbapenem resistance on clinical and economic outcomes among patients with *Acinetobacter baumannii* infection in Colombia. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(2):174-80.
4. Kelly AM, Mathema B, Larson EL. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. *International journal of antimicrobial agents*. 2017;50(2):127-34.
5. Organization WH. Global action plan on antimicrobial resistance 2015. Available from: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>.
6. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Report. United States, Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, Prevention CfDCA; 2019 November 13, 2019. Report No.
7. OPS/OMS. Alerta Epidemiológica: Enterobacterias con resistencia transferible a colistina, implicaciones para la salud publica en las Américas. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. , 2016 10 de Juni de 2016. Report No.
8. O'NEILL J. Review on Antimicrobial Resistance, Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report And Recommendations. 7 March 2017.
9. Mojica MF, Bonomo RA, Fast W. B1-Metallo-beta-Lactamases: Where Do We Stand? *Current drug targets*. 2016;17(9):1029-50.
10. Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC microbiology*. 2017;17(1):101.
11. Toleman MA, Spencer J, Jones L, Walsh TR. blaNDM-1 is a chimera likely constructed in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(5):2773-6.
12. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious diseases*. 2010;10(9):597-602.
13. Reyes JA, Melano R, Cardenas PA, Trueba G. Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American Enterobacterales. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2020.
14. (INS). INdS. Informe epidemiológico

“Vigilancia por laboratorio de resistencia a los antimicrobianos en infecciones asociadas a la

atención en salud septiembre 2012 a diciembre 2014. 2015 2015. Report No.

15. Soontaros S, Leelakanok N. Association between carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and death: A systematic review and meta-analysis. *American journal of infection control*. 2019.
16. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology reviews*. 2018;31(4).
17. Marquez-Ortiz RA, Haggerty L, Olarte N, Duarte C, Garza-Ramos U, Silva-Sanchez J, et al. Genomic Epidemiology of NDM-1-Encoding Plasmids in Latin American Clinical Isolates Reveals Insights into the Evolution of Multidrug Resistance. *Genome biology and evolution*. 2017;9(6):1725-41.
18. Barrios H, Garza-Ramos U, Reyna-Flores F, Sanchez-Perez A, Rojas-Moreno T, Garza-Gonzalez E, et al. Isolation of carbapenem-resistant NDM-1-positive *Providencia rettgeri* in Mexico. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(8):1934-6.
19. Chen Z, Li H, Feng J, Li Y, Chen X, Guo X, et al. NDM-1 encoded by a pNDM-BJ01-like plasmid p3SP-NDM in clinical *Enterobacter aerogenes*. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:294.
20. O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(4):534-46.
21. Abdallah M, Balshi A. First literature review of carbapenem-resistant *Providencia*. *New microbes and new infections*. 2018;25:16-23.
22. Wang TK, Ahn Y, Dunlop J. *Providencia rettgeri* peritonitis in a patient on peritoneal dialysis with perforated appendicitis. *Peritoneal dialysis international : journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*. 2014;34(5):569-70.
23. Tshisevhe VS, Lekalakala MR, Tshuma N, Janse van Rensburg S, Mbelle N. Outbreak of carbapenem-resistant *Providencia rettgeri* in a tertiary hospital. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*. 2016;107(1):31-3.
24. Broomfield RJ, Morgan SD, Khan A, Stickler DJ. Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. *Journal of medical microbiology*. 2009;58(Pt 10):1367-75.
25. Sharma D, Sharma P, Soni P. First case report of *Providencia Rettgeri* neonatal sepsis. *BMC research notes*. 2017;10(1):536.
26. Yoh M, Matsuyama J, Ohnishi M, Takagi K, Miyagi H, Mori K, et al. Importance of *Providencia* species as a major cause of travellers' diarrhoea. *Journal of medical microbiology*. 2005;54(Pt 11):1077-82.
27. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(3):268-81.
28. Shin S, Jeong SH, Lee H, Hong JS, Park MJ, Song W. Emergence of multidrug-resistant *Providencia rettgeri* isolates co-producing NDM-1 carbapenemase and PER-1 extended-spectrum beta-lactamase causing a first outbreak in Korea. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2018;17(1):20.

29. Charan J, Mulla S, Ryavanki S, Kantharia N. New Delhi Metallo-beta lactamase-1 containing enterobacteriaceae: origin, diagnosis, treatment and public health concern. *The Pan African medical journal*. 2012;11:22.
30. Bush K, Bradford PA. beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2016;6(8).
31. Kadavy DR, Hornby JM, Haverkost T, Nickerson KW. Natural antibiotic resistance of bacteria isolated from larvae of the oil fly, *Helaeomyia petrolei*. *Applied and environmental microbiology*. 2000;66(11):4615-9.
32. Li XZ, Plesiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(2):337-418.
33. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum*. 2016;4(2).
34. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1980;289(1036):321-31.
35. Palacios AR, Mojica MF, Giannini E, Taracila MA, Bethel CR, Alzari PM, et al. The Reaction Mechanism of Metallo-beta-Lactamases Is Tuned by the Conformation of an Active-Site Mobile Loop. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019;63(1).
36. Stewart AC, Bethel CR, VanPelt J, Bergstrom A, Cheng Z, Miller CG, et al. Clinical Variants of New Delhi Metallo-beta-Lactamase Are Evolving To Overcome Zinc Scarcity. *ACS infectious diseases*. 2017;3(12):927-40.
37. Lee HW, Kang HY, Shin KS, Kim J. Multidrug-resistant *Providencia* isolates carrying blaPER-1, blaVIM-2, and armA. *Journal of microbiology*. 2007;45(3):272-4.
38. Oikonomou O, Liakopoulos A, Phee LM, Betts J, Mevius D, Wareham DW. *Providencia stuartii* Isolates from Greece: Co-Carriage of Cephalosporin (blaSHV-5, blaVEB-1), Carbapenem (blaVIM-1), and Aminoglycoside (rmtB) Resistance Determinants by a Multidrug-Resistant Outbreak Clone. *Microbial drug resistance*. 2016;22(5):379-86.
39. Potter RF, Wallace MA, McMullen AR, Prusa J, Stallings CL, Burnham CAD, et al. blaIMP-27 on transferable plasmids in *Proteus mirabilis* and *Providencia rettgeri*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018;24(9):1019 e5- e8.
40. Otlu B, Yakupogullari Y, Gursoy NC, Duman Y, Bayindir Y, Tekerekoglu MS, et al. [Co-production of OXA-48 and NDM-1 Carbapenemases in *Providencia rettgeri*: the first report]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2018;52(3):300-7.
41. Saavedra-Rojas SY, Duarte-Valderrama C, Gonzalez-de-Arias MN, Ovalle-Guerro MV. Emergence of *Providencia rettgeri* NDM-1 in two departments of Colombia, 2012-2013. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2017;35(6):354-8.
42. Zurita J, Parra H, Gestal MC, McDermott J, Barba P. First case of NDM-1-producing *Providencia rettgeri* in Ecuador. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2015;3(4):302-3.
43. Gefen-Halevi S, Hindiyeh MY, Ben-David D, Smollan G, Gal-Mor O, Azar R, et al. Isolation of genetically unrelated bla(NDM-1)-positive *Providencia rettgeri* strains in Israel. *Journal of clinical microbiology*. 2013;51(5):1642-3.
44. Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA, Alizai SA, Hussain A, Ghirardi S, et al. Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(10):2288-94.

45. Lascols C, Hackel M, Marshall SH, Hujer AM, Bouchillon S, Badal R, et al. Increasing prevalence and dissemination of NDM-1 metallo-beta-lactamase in India: data from the SMART study (2009). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(9):1992-7.
46. Ho PL, Siu JT, Law PY, Lai EL, Tse CW, Lee R, et al. Low prevalence of vancomycin heteroresistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing bacteraemia in Hong Kong. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;40(6):564-6.
47. Tijet N, Richardson D, MacMullin G, Patel SN, Melano RG. Characterization of multiple NDM-1-producing Enterobacteriaceae isolates from the same patient. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(6):3648-51.
48. Fernandez-Lopez R, Redondo S, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F. Towards a taxonomy of conjugative plasmids. *Current opinion in microbiology*. 2017;38:106-13.
49. Babakhani S, Oloomi M. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *Journal of basic microbiology*. 2018;58(11):905-17.
50. Guerillot R, Siguier P, Gourbeyre E, Chandler M, Glaser P. The diversity of prokaryotic DDE transposases of the mutator superfamily, insertion specificity, and association with conjugation machineries. *Genome biology and evolution*. 2014;6(2):260-72.
51. Shirasawa K, Hirakawa H, Tabata S, Hasegawa M, Kiyoshima H, Suzuki S, et al. Characterization of active miniature inverted-repeat transposable elements in the peanut genome. *TAG Theoretical and applied genetics Theoretische und angewandte Genetik*. 2012;124(8):1429-38.
52. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Gottig S, Hunfeld KP, et al. Molecular characterization of blaNDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(9):1998-2001.
53. Poirel L, Bonnin RA, Boulanger A, Schrenzel J, Kaase M, Nordmann P. Tn125-related acquisition of blaNDM-like genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(2):1087-9.
54. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(6):2227-38.
55. Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, et al. Broad-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS microbiology reviews*. 2010;34(3):295-316.
56. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-20.
57. Velappan N, Sblattero D, Chasteen L, Pavlik P, Bradbury AR. Plasmid incompatibility: more compatible than previously thought? *Protein engineering, design & selection : PEDS*. 2007;20(7):309-13.
58. Ho PL, Li Z, Lo WU, Cheung YY, Lin CH, Sham PC, et al. Identification and characterization of a novel incompatibility group X3 plasmid carrying bla NDM-1 in Enterobacteriaceae isolates with epidemiological links to multiple geographical areas in China. *Emerging microbes & infections*. 2012;1(11):e39.
59. Wailan AM, Paterson DL, Kennedy K, Ingram PR, Bursle E, Sidjabat HE. Genomic Characteristics of NDM-Producing Enterobacteriaceae Isolates in Australia and Their blaNDM Genetic Contexts. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(1):136-41.
60. Mataseje LF, Boyd DA, Lefebvre B, Bryce E, Embree J, Gravel D, et al. Complete sequences of a novel blaNDM-1-harboring plasmid from *Providencia rettgeri* and an FII-

- type plasmid from *Klebsiella pneumoniae* identified in Canada. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(3):637-42.
61. Márquez-Ortiz RA. Análisis de los elementos genéticos involucrados en la movilización del gen bla_{NDM-1} en bacterias multirresistentes colombianas. Bogotá D.C. : Universidad Nacional de Colombia; 2017.
 62. Moscoso Romo MP. Participación de los sistemas de muerte post-segregacional en la estabilidad de la resistencia a carbapenémicos en Enterobacterias
María Paz Moscoso Romo. Bogotá D.C., Colombia: Universidad Nacional de Colombia 2019.
 63. Cervantes Caballero E. Caracterización molecular y genómica de aislamientos clínicos de *Providencia rettgeri* productores de carbapenemasas. Cuernavaca, Morelos: INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA ESCUELA DE SALUD PÚBLICA DE MÉXICO; 2019.
 64. Wingett SW, Andrews S. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research*. 2018;7:1338.
 65. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*. 2012;19(5):455-77.
 66. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072-5.
 67. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068-9.
 68. Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, et al. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nature methods*. 2013;10(6):563-9.
 69. Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M, Rajandream MA, Barrell BG, Parkhill J. ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics*. 2005;21(16):3422-3.
 70. Krumsiek J, Arnold R, Rattei T. Gepard: a rapid and sensitive tool for creating dotplots on genome scale. *Bioinformatics*. 2007;23(8):1026-8.
 71. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2010;26(5):589-95.
 72. Hunt M, Silva ND, Otto TD, Parkhill J, Keane JA, Harris SR. Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. *Genome biology*. 2015;16:294.
 73. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. 1990;215(3):403-10.
 74. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(11):2640-4.
 75. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. 2015;31(22):3691-3.
 76. Loytynoja A. Phylogeny-aware alignment with PRANK. *Methods in molecular biology*. 2014;1079:155-70.
 77. Talavera G, Castresana J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic biology*. 2007;56(4):564-77.

78. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014;30(9):1312-3.
79. Huson DH, Scornavacca C. Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. *Systematic biology*. 2012;61(6):1061-7.
80. Mount DW. Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *CSH protocols*. 2007;2007:pdb top17.
81. Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(7):3895-903.
82. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*. 2011;27(7):1009-10.
83. Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC genomics*. 2011;12:402.
84. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of microbiological methods*. 2005;63(3):219-28.
85. Harmer CJ, Hall RM. IS26-Mediated Precise Excision of the IS26-aphA1a Translocatable Unit. *mBio*. 2015;6(6):e01866-15.
86. Brown NL, Evans LR. Transposition in prokaryotes: transposon Tn501. *Research in microbiology*. 1991;142(6):689-700.
87. Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic acids research*. 2006;34(Database issue):D32-6.
88. Garcillán-Barcia M BI, Mendiola M, De La Cruz F. IS91 Rolling-Circle Transposition. *ASM Press, Washington, DC (ed), C doi: . 2002(In Craig N, Craigie R, Gellert M, Lambowitz A. Mobile DNA II.):891-904.*
89. Bernales I, Mendiola MV, de la Cruz F. Intramolecular transposition of insertion sequence IS91 results in second-site simple insertions. *Molecular microbiology*. 1999;33(2):223-34.
90. Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neubock R, Hofacker IL. The Vienna RNA websuite. *Nucleic acids research*. 2008;36(Web Server issue):W70-4.
91. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*. 2013;30(4):772-80.
92. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2-- a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. 2009;25(9):1189-91.
93. Kamruzzaman M, Iredell J. A ParDE-family toxin antitoxin system in major resistance plasmids of Enterobacteriaceae confers antibiotic and heat tolerance. *Scientific reports*. 2019;9(1):9872.
94. Decraene V, Phan HTT, George R, Wyllie DH, Akinremi O, Aiken Z, et al. A Large, Refractory Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Demonstrates Carbapenemase Gene Outbreaks Involving Sink Sites Require Novel Approaches to Infection Control. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(12).

95. Huguet KT, Gonnet M, Doublet B, Cloeckert A. A toxin antitoxin system promotes the maintenance of the IncA/C-mobilizable Salmonella Genomic Island 1. *Scientific reports*. 2016;6:32285.
96. Szekeres S, Dauti M, Wilde C, Mazel D, Rowe-Magnus DA. Chromosomal toxin-antitoxin loci can diminish large-scale genome reductions in the absence of selection. *Molecular microbiology*. 2007;63(6):1588-605.
97. Wozniak RA, Waldor MK. A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS genetics*. 2009;5(3):e1000439.
98. Takeuchi D, Akeda Y, Yoshida H, Hagiya H, Yamamoto N, Nishi I, et al. Genomic reorganization by IS26 in a blaNDM-5-bearing FII plasmid of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a patient in Japan. *Journal of medical microbiology*. 2018;67(9):1221-4.
99. Weber RE, Pietsch M, Fruhauf A, Pfeifer Y, Martin M, Luft D, et al. IS26-Mediated Transfer of bla NDM-1 as the Main Route of Resistance Transmission During a Polyclonal, Multispecies Outbreak in a German Hospital. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:2817.
100. Sheppard AE, Stoesser N, Wilson DJ, Sebra R, Kasarskis A, Anson LW, et al. Nested Russian Doll-Like Genetic Mobility Drives Rapid Dissemination of the Carbapenem Resistance Gene blaKPC. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(6):3767-78.
101. Partridge SR, Iredell JR. Genetic contexts of blaNDM-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(11):6065-7; author reply 71.
102. Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14 Suppl 1:33-41.
103. Canton R, Gonzalez-Alba JM, Galan JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in microbiology*. 2012;3:110.
104. Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(9):3045-9.