

**Caracterización de los elementos transponibles NTE_{KPC} en aislamientos clínicos
Colombianos de *Pseudomonas aeruginosa***

Autor:

Julián Santiago Ruiz Castellanos

Universidad El Bosque

Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana LGMB

Facultad de Ciencias Bogotá – 2021

Caracterización de los elementos transponibles NTE_{KPC} en aislamientos clínicos

Colombianos de *Pseudomonas aeruginosa*

Autor: Julián Santiago Ruiz Castellanos

Directores:

Ricaurte Alejandro Márquez Ortiz, PhD

Deisy Abril Riaño, MSc

Laboratorio De Genética Molecular Bacteriana

LGMB

Universidad El Bosque

Facultad de Ciencias

Bogotá – 2021

Agradecimientos

Este trabajo es el fruto de la ayuda, el apoyo y conocimiento que me ha aportado muchas personas en este año durante el desarrollo del proyecto.

Agradezco al laboratorio de Genética Molecular bacteriana por acogerme y guiarme durante mi proceso de aprendizaje; aprendí algo hasta el último minuto. Agradezco especialmente a mis directores Alejandro Márquez Ortiz y Deisy Abril Riaño quienes con su acompañamiento me han orientado y corregido minuciosamente para poder mejorar como profesional y para que este trabajo se desarrollara de la mejor forma posible. Igualmente, a agradecer a Zayda Corredor que también han contribuyó a mi proceso de formación y facilitando el desarrollo de mis experimentos y que junto a Javier Escobar aportaron con sus comentarios y críticas constructivas.

Y al resto de personas del Laboratorio, los estudiantes de maestría Santiago Ávila y Paula Trujillo a las biólogas Ginna Tijero y Lorena Cortes; y a mi compañera Daniela Forero.

Adicionalmente a Yu-Kuo, Kristopher Liu y por su amabilidad y gentileza al momento de donar un plásmido control para el desarrollo de este proyecto.

Y finalmente a mi familia, por su apoyo incondicional.

Nota de salvedad

“La Universidad El Bosque no se hace responsable de los conceptos emitidos por el Investigador en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético de este en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo oportunista capaz de producir infecciones en pacientes de alto riesgo. La multiresistencia de este organismo ha aumentado debido a la presencia de genes para carbapenemasas de tipo serina como *bla*_{KPC}, gen descubierto en *Klebsiella pneumoniae* y movilizado por transferencia horizontal a otras especies y géneros bacterianos; su diseminación se ha dado principalmente por el transposón Tn4401, un elemento genético capaz de movilizar al gen *bla*_{KPC} de una región del genoma a otra y que contribuye a su diseminación mediante transferencia horizontal de genes. Sin embargo, recientemente en *K. pneumoniae* se han encontrado algunos elementos genéticos no convencionales (NTE_{KPC}) asociados a *bla*_{KPC}. El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar *in silico* un nuevo elemento NTE_{KPC} encontrado en *P. aeruginosa* para contribuir con información que permita dilucidar diferentes mecanismos de diseminación de este determinante de resistencia, este nuevo elemento se clasificó como NTE_{KPC}-IIf. Adicionalmente se buscó establecer la frecuencia de este tipo de elementos en un grupo de aislamientos encontrados en la ciudad de Bogotá y el municipio de Chía, Colombia. La caracterización molecular del Tn4401 (a-i) y los NTE_{KPC} fue realizada mediante diferentes PCR que creando un método de detección y diferenciación del entorno genético de *bla*_{KPC} basado en los elementos reportados hasta la fecha. Los resultados obtenidos demostraron que, a pesar de que el Tn4401 fue el elemento con mayor prevalencia, el NTE_{KPC}-IIf se presentó en un número significativo de aislamientos (29.5%), y que este elemento es capaz de circular en diferentes linajes genéticos y en diferentes instituciones en la región.

Abstract

P. aeruginosa is an opportunistic microorganism capable of causing infections in high-risk patients. The multiresistance of this organism has increased due to the presence of genes for carbapenemases such as *bla*_{KPC}, a gene discovered in *K. pneumoniae* and mobilized by horizontal transfer to other bacterial species and genera; its dissemination has been mainly due to Tn4401. However, recently in *K. pneumoniae* some unconventional genetic elements (NTE_{KPC}) associated with *bla*_{KPC} have been found. The objective of this work was to characterize in silico a new NTE_{KPC} element found in *P. aeruginosa* to contribute with information that allows to elucidate different dissemination mechanisms of this resistance determinant. This new element was classified as NTE_{KPC}-III_f. Additionally, it was sought to establish the frequency of this type of elements in a group of isolates found in the city of Bogotá and the municipality of Chía, Colombia. The molecular characterization of the Tn4401 (a-i) and the NTE_{KPC}s were carried out using different PCRs that created a method of detection and differentiation of the genetic environment of *bla*_{KPC} based on the elements reported to date. The results obtained showed that, despite the fact that Tn4401 was the element with the highest prevalence, NTE_{KPC}-III_f was present in a significant number of isolates (29.5%), and that this element is capable of circulating in different genetic lineages and in different institutions in the region.

Contenido

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Introducción | 1 |
| 2 | Marco de referencia | 4 |
| 2.1 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como organismo de estudio..... | 4 |
| 2.1.1 | Generalidades..... | 4 |
| 2.1.2 | Pared bacteriana y su biosíntesis..... | 5 |
| 2.2 | Antibióticos betalactámicos | 7 |
| 2.3 | Resistencia a carbapenémicos | 8 |
| 2.4 | Elementos genéticos móviles | 9 |
| 2.5 | Secuencias de inserción (SI)..... | 9 |
| 2.6 | Transposones (Tn)..... | 10 |
| 2.6.1 | Tn4401 | 11 |
| 2.6.2 | NTE _{KPC} | 12 |
| 3 | Justificación | 15 |
| 4 | Preguntas de Investigación | 18 |
| 5 | Objetivos del proyecto | 19 |
| 5.1 | Objetivo general | 19 |
| 5.2 | Objetivos específicos..... | 19 |
| 6 | Métodos | 20 |

| | | |
|-------|--|----|
| 6.1 | Metodología de la fase <i>in silico</i> | 20 |
| 6.1.1 | Caracterización de la región NTE _{KPC} del aislamiento clínico de <i>P. aeruginosa</i> 34Pae23..... | 20 |
| 6.1.2 | Diseño de cebadores..... | 21 |
| 6.2 | Metodología del análisis experimental..... | 22 |
| 6.2.1 | Estandarización de las PCR diseñadas Amplificación de la región corriente arriba del gen <i>bla</i> _{KPC} para la caracterización de los elementos genéticos transponibles..... | 22 |
| 6.2.2 | Controles para la ejecución de las PCR..... | 22 |
| 6.2.3 | Determinación de la frecuencia de regiones NTE _{KPC} en una cohorte de aislamientos clínicos de <i>Pseudomona aeruginosa</i> | 23 |
| 7 | Resultados..... | 25 |
| 7.1 | Análisis genómico del aislamiento 34Pae23..... | 25 |
| 7.1.1 | Determinación de los marcos abiertos de lectura del plásmido p34Pae23..... | 25 |
| 7.1.2 | Análisis de las plataformas asociadas a la movilización de <i>bla</i> _{KPC} | 25 |
| 7.1.3 | Comparación de las plataformas de movilización Tn4401 reportadas con el elemento NTE _{KPC} presente en p34Pae23..... | 27 |
| 7.1.4 | Comparación de los NTE _{KPC} reportados con el elemento NTE _{KPC} presente en p34Pae23.... | 30 |
| 7.1.5 | Análisis de los promotores de <i>bla</i> _{KPC} en el NTE _{KPC} -IIf..... | 33 |
| 7.2 | Análisis de la frecuencia de EGM en los aislamientos..... | 37 |
| 7.2.1 | Diseño y estandarización de las PCR..... | 37 |

| | | |
|---------|---|----|
| 7.2.1.1 | Estrategia de diseño de cebadores para la PCR específica para el Tn4401 | 37 |
| 7.2.1.2 | Estrategia de diseño de Cebadores enfocados a elementos NTE _{KPC} | 40 |
| 7.2.2 | Estandarización de las PCR | 43 |
| 7.2.3 | Análisis de los elementos genéticos asociados al gen bla _{KPC} en una cohorte de aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> de circulación en Bogotá y Chía. | 45 |
| 7.2.3.1 | Caracterización del entorno genético asociado a bla _{KPC} en los aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> | 46 |
| 8 | Discusión | 51 |
| 9 | Conclusiones..... | 60 |
| 10 | Recomendaciones..... | 59 |
| 11 | Limitaciones..... | 60 |
| 10 | Bibliografía | 63 |
| 11 | Anexos | 70 |

Lista de Tablas

| | |
|--|----|
| <i>Tabla 1.</i> Elementos NTE _{KPC} reportados hasta la fecha (Nov, 2021) | 30 |
| <i>Tabla 2.</i> Regiones promotoras corriente arriba de <i>bla</i> _{KPC} encontradas en el NTE _{KPC} -II _f presente en el plásmido p34Pae23. | 33 |
| <i>Tabla 3.</i> Productos de PCR para las parejas de oligonucleótidos | 39 |
| <i>Tabla 4.</i> Tamaño de los amplicones generados en los diferentes NTE _{KPC} , por las PCR específicas para su identificación. | 41 |

Lista de Figuras

| | |
|--|----|
| <i>Figura 1.</i> Simplificación de la biosíntesis de peptidoglucano. | 6 |
| <i>Figura 2.</i> Estructura química de los antibióticos beta-lactámicos | 7 |
| <i>Figura 3.</i> Representación de la estructura general del transposón Tn4401b | 12 |
| <i>Figura 4.</i> Alineamientos pareados de las secuencias NTE _{KPC} | 14 |
| <i>Figura 5.</i> Análisis del elemento NTE _{KPC} presente en el plásmido p34Pae23 | 26 |
| <i>Figura 6.</i> Comparación mediante alineamientos pareados entre el NTE _{KPC} -IIf identificado en este estudio con las diferentes variantes del Tn4401 (a-i)..... | 29 |
| <i>Figura 7.</i> Comparación esquemática del elemento NTE _{KPC} -IIf y los diferentes subgrupos conocidos de los NTE _{KPC} (Non Tn4401 Elements). | 32 |
| <i>Figura 8.</i> Regiones corrientes arriba de <i>bla</i> _{TEM} y <i>bla</i> _{KPC} ; en donde se ubican los promotores Px, PP5 y PP3. | 36 |
| <i>Figura 9.</i> Representación de la ubicación de los oligonucleótidos de la PCR específica para el Tn4401 y sus variantes. | 38 |
| <i>Figura 10.</i> Representación esquemática de la ubicación del cebador GN790 en conjunto con GN792, GN793 y GN794 para la amplificación diferencial de NTE _{KPC} -III, NTE _{KPC} -II y NTE _{KPC} -I, respectivamente..... | 42 |
| <i>Figura 11.</i> Condiciones para las PCR diseñadas en este estudio..... | 43 |
| <i>Figura 12.</i> Estandarización de las PCR..... | 43 |
| <i>Figura 13.</i> Comparación entre los Δ <i>bla</i> _{TEM} que albergan los diferentes NTE _{KPC} -II. <i>bla</i> _{TEM} y <i>bla</i> _{KPC} ... | 44 |
| <i>Figura 14.</i> Distribución de las instituciones y aislamiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> incluidos en este estudio. | 45 |

| | |
|---|----|
| <i>Figura 15.</i> Resultados de las PCR usando oligonucleótidos específicos para el Tn4401 en los aislamientos..... | 47 |
| <i>Figura 16.</i> Amplificación por PCR de la región adyacente al gen <i>bla</i> _{KPC} usando oligonucleótidos específicos para los elementos NTE _{KPC} | 48 |
| <i>Figura 17.</i> Frecuencia de los elementos asociado a <i>bla</i> _{KPC} en los aislamientos de este estudio..... | 50 |
| <i>Figura 18.</i> Ubicación de los cebadores para NTE _{KPC} -IIe..... | 55 |
| <i>Figura 19.</i> Línea de tiempo general que indica la presencia de uno de los aislamientos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> KPC positivos evaluados en este estudio..... | 59 |

Tabla de anexos

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Genes de resistencia antibiótica encontrados mediante el uso de ResFinder (Bortolaia et al., 2020) en el genoma del aislamiento 34Pae23..... | 70 |
| Anexo 2. Mecanismos de resistencia intrínseca de <i>P. aeruginosa</i> encontrados en este aislamiento. | 71 |
| Anexo 3. Comparación esquemática de los alineamientos pareados entre el elemento genético móvil presente en el plásmido p34Pae23 y los diferentes NTE _{KPC} reportados hasta la fecha a) Ia b) Ib c) Ic d) Id e) IIa f) IIb g) IIc h) IId i) III. | 72 |
| Anexo 4. . Resultados del MLST (Multi-Locus Sequence type) en el 34Pae23; mediante el uso de la plataforma PubMLST (Jolley et al., 2018) | 72 |

1 Introducción

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria responsable de múltiples infecciones en el torrente sanguíneo, pulmonar, en tracto urinario y en tejidos blandos, además de ser considerada la causa más común de infecciones respiratorias persistentes. Las enfermedades causadas por este organismo son contraídas principalmente por pacientes ingresados en un centro de atención a la salud, especialmente en las unidades de cuidados intensivos (UCI) (Arango Alvarado, 2014; Maraolo et al., 2017; Todar, 2015; Winstanley et al., 2009). Actualmente, este organismo produce una mortalidad de aproximadamente 30% en pacientes con inmunosupresión (Oliver et al., 2015) y raramente infecta a pacientes inmunocompetentes.

El suministro de tratamiento antibiótico a pacientes infectados puede ser ineficiente en muchos casos, debido a que *P. aeruginosa* posee una amplia gama de mecanismos que le confieren resistencia a una gran cantidad de familias de antibióticos (Remolina Granados & Escobar Castaño, 2017). Entre los antibióticos efectivos contra *P. aeruginosa* se destacan algunos β -lactámicos (como el cefepime y carbapenémicos como meropenem, imipenem, y doripenem), considerados el grupo más ampliamente usado entre los antibióticos por su eficacia contra un amplio espectro de bacterias (El-Gamal et al., 2017). Sin embargo, la circulación de bacterias portadoras de genes que codifican para la producción de enzimas que inhiben la acción de los antibióticos es cada vez mayor, pues dichos genes son continuamente transmitidos por transferencia horizontal, lo cual ha causado el surgimiento de nuevas clases de bacterias multirresistentes que se han convertido en un problema de salud pública alrededor del mundo (Remolina Granados & Escobar Castaño, 2017).

La creciente influencia de organismos multirresistentes está vinculada a una morbilidad y mortalidad superiores, especialmente en pacientes críticamente enfermos. Según lo reportado por el Instituto

nacional de salud, los porcentajes de resistencia a carbapenémicos de *P. aeruginosa* en adultos oscilaron en un rango entre 25.2% y 28.7% y en UCI pediátrica entre 17.2% y 23.1% (INS, 2019; Maraolo et al., 2017). Se estima que en muchas áreas en las que *P. aeruginosa* ha logrado establecerse, existe una prevalencia de *Pseudomonas* spp. MDR (multi-drug resistant) de entre el 15 y el 30%. El gen *bla*_{KPC}, codifica para la expresión de la β-lactamasa KPC, una enzima que inicialmente se reportó en *K. pneumoniae*, siendo este organismo su principal portador, sin embargo, este gen están presente en otras enterobacterias, como *Escherichia coli* o *Salmonella enterica* y más recientemente (en 2007) en *P. aeruginosa*, siendo el primer registro en un organismo no perteneciente a enterobacterias, y que a su vez se presentó en Colombia (Córdova et al., 2012; Vera-Leiva et al., 2017; Villegas et al., 2007). Gran parte del incremento en la diseminación y adquisición del gen *bla*_{KPC} se debe a elementos genéticos móviles (EGM); secuencias de ADN que tienen la capacidad de trasladarse a otra región del ADN o transponerse a plásmidos conjugativos que contribuyen a la transferencia horizontal de genes, siendo una de las principales causas de propagación de la resistencia a antimicrobianos en general (Benneth, 2004).

En el caso de *bla*_{KPC}, el principal EGM asociado a su diseminación hacia nuevas estructuras genéticas es el Tn4401, un transposón que se asocia principalmente a plásmidos y clones de alto riesgo que facilitan la propagación de KPC, como en el caso del clon ST258 de *Klebsiella pneumoniae* (L. Chen et al., 2013; L. Chen, Mathema, et al., 2014; Cuzon et al., 2011; Naas et al., 2008). Sin embargo, en los últimos años se han identificado diferentes elementos no relacionados a los Tn4401. Estos elementos son conocidos como NTE_{KPC} (Non-Tn4401 related element), y que pueden tener un papel relevante en la diseminación de *bla*_{KPC} (L. Chen, Chavda, et al., 2014; de Lima et al., 2020). Aunque el Tn4401 ha sido muy importante para la diseminación horizontal de *bla*_{KPC}, la presencia de los NTE_{KPC} en otras bacterias pone en evidencia un mecanismo adicional de movilización de este gen de resistencia. En *P. aeruginosa* la

información está mayormente enfocada en la resistencia antibiótica, por lo que la relevancia de estos nuevos elementos para la diseminación de la resistencia a carbapenémicos no ha sido tan estudiada. En el presente trabajo se describe un NTE_{KPC} de *P. aeruginosa* perteneciente a una cohorte de aislamientos clínicos de circulación en hospitales de Bogotá. Posteriormente se diseñó un método para la determinación por PCR de las variantes de los elementos NTE_{KPC} y se indago por la frecuencia de circulación de dichos elementos en la cohorte. Esta información permitirá aportar en el conocimiento de los mecanismos de movilización y diseminación de la resistencia a carbapenémicos en *P. aeruginosa*, que, a largo plazo, se espera pueda ser utilizado como insumo para el desarrollo de estrategias de contención de la diseminación de la resistencia en esta bacteria.

2 Marco de referencia

2.1 *Pseudomonas aeruginosa* como organismo de estudio

2.1.1 Generalidades

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gramnegativo no fermentador, considerado un patógeno oportunista nosocomial. Es descrito como un bastón de tamaño aproximado de 0.5-1 μm de diámetro y 1.5-5 μm de largo, posee un flagelo polar del cual depende para movilizarse (Zarza et al., 2019). Tiene una amplia adaptabilidad genética que le confiere resistencia a múltiples condiciones que para otros organismos del género *Pseudomonas* serían consideradas adversas, por ejemplo, su capacidad de generar colonias a temperaturas superiores a 42°C. Sin embargo, su crecimiento óptimo se encuentra entre el rango de 20°C a 43°C (Arango Alvarado, 2014). Su persistencia a diferentes condiciones medioambientales facilita su supervivencia en el agua, en el suelo o incluso en entornos inertes con requerimientos nutritivos escasos (Rossi, 2006; Ruiz Martínez, 2007).

Como patógeno, es causante de múltiples infecciones con un alto índice de morbimortalidad en el tracto respiratorio, urinario e infecciones generalizadas; actualmente se tiene registro de infecciones corneales y queratitis causadas por este organismo (Arango Alvarado, 2014). El tratamiento para estas infecciones debe suministrarse con precaución debido a la resistencia intrínseca de este microorganismo, y a que el uso inadecuado de antibióticos (automedicación, la selección terapéutica inadecuada y concentraciones subinhibitorias) favorecen la selección de clones multirresistentes. Adicionalmente, se debe tener presente que *P. aeruginosa* es uno de los patógenos que causan mayor preocupación a nivel de salud pública, al ser la principal causa de neumonías e infecciones del tracto urinario en pacientes hospitalizados (Ruiz Martínez, 2007).

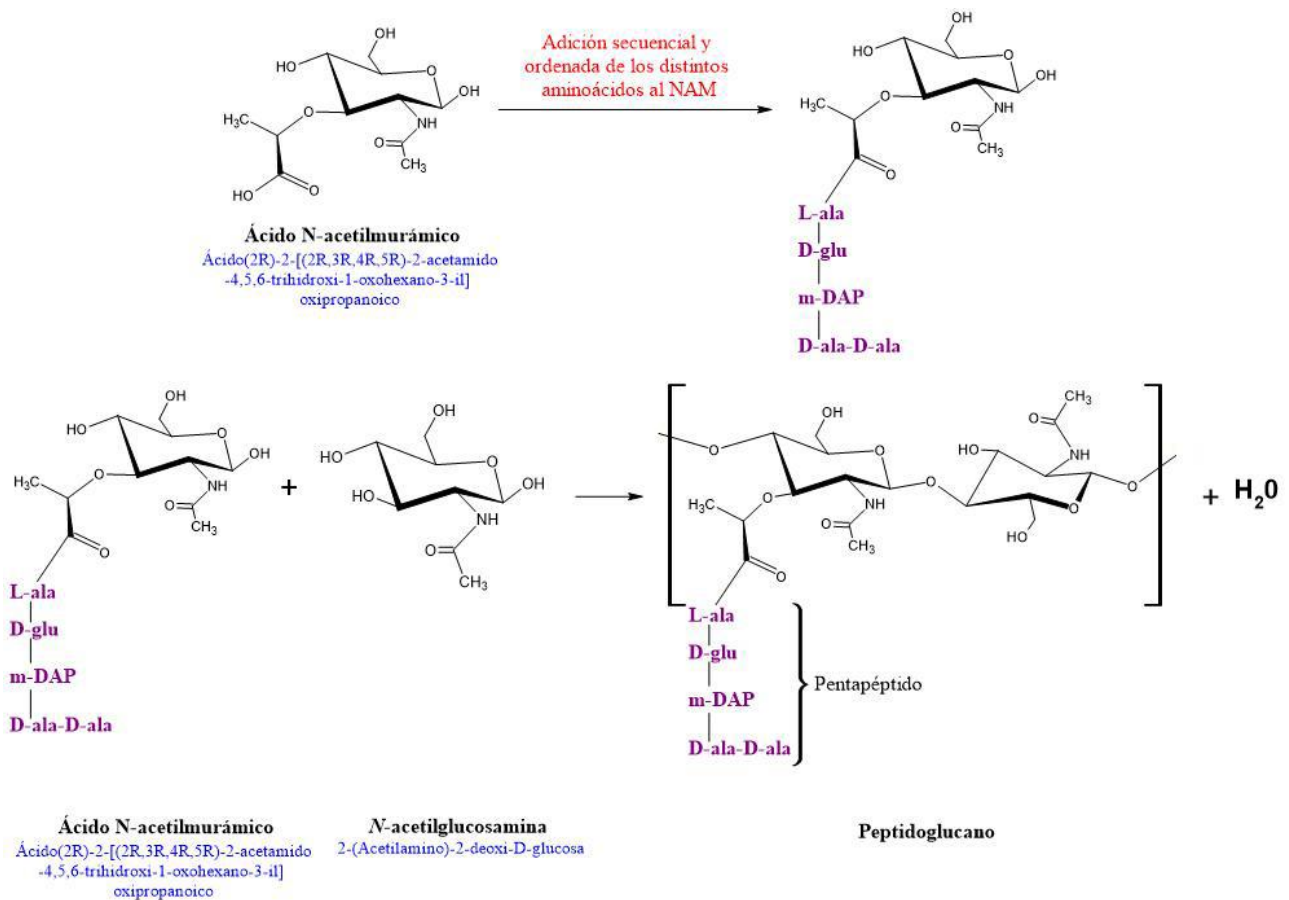
2.1.2 Pared bacteriana y su biosíntesis

Al ser una bacteria gram-negativa, su envoltura celular está constituida por dos membranas celulares que rodean la pared celular de mureína, también llamado peptidoglucano. Las capas interna y externa poseen ligeras diferencias en composición; mientras la membrana interna posee la composición habitual de una membrana plasmática, la membrana externa comprende un complejo de lipopolisacáridos, que le confieren una carga negativa total a la envoltura bacteriana; además de ayudar a la bacteria a lidiar con las condiciones del medio exterior, impulsando la capacidad patógena del microorganismo y protegiendo a las bacterias de la acción de varios antibióticos u otros compuestos, que normalmente podrían penetrar la membrana interna o la pared celular de peptidoglucano, lo cual hace que este tipo de bacterias presenten resistencia a antibióticos la penicilina.(Peleg & Hooper, 2010; Selmann & Holst, 2002). Por otra parte, la pared bacteriana proporciona integridad estructural a la célula, esto debido al peptidoglucano, que le proporciona rigidez a la misma, protegiendo a la célula al otorgarle resistencia a la turgencia (Vollmer et al., 2008).

El peptidoglucano, es un polímero compuesto por dos monosacáridos (N-acetil-glucosamina y el Ácido N-acetilmurámico) y una cadena tetrapeptídica (compuesta por 4 aminoácidos) (Schumann, 2011; Vollmer et al., 2008). Su formación se lleva a cabo inicialmente en el espacio intracelular, mediante la síntesis de compuestos precursores de nucleótidos activados solubles; UDP-*N*-acetilglucosamina y UDP-*N*-acetilmuramil pentapéptido. El UDP (uridina difosfato) ayuda a los precursores a su activación (De Jonge et al., 1989). Posterior a este proceso, la cadena Pentapeptídica se van uniendo de manera secuencial y ordenada al UDP-NAM, siendo el primero en adherirse al L- alanina y la D- alanina-D- alanina el ultimo (Figura 1). En este momento, las moléculas se unen a transportadores de membrana; el UDP-NAM, se une al undecaprenil-fosfato o bactoprenol, y el UDP-NAG a una transferasa. Una vez

unidos a sus respectivos transportadores de membrana se forma el enlace $\beta(1,4)$ -glucosídico. Y el bactoprenol sufre un proceso de “flipflop”, haciendo que las moléculas queden expuestas al medio acuoso. A este punto la molécula se incorpora a la pared, sin embargo, sigue unida al undecaprenil-fosfato en su forma piro fosforilada, por lo que ese elimina el fosfato terminal y se separa de la molécula para iniciar la síntesis de otra molécula de peptidoglicano.

Figura 1. Simplificación de la biosíntesis de peptidoglicano. Unión de un monómero de peptidoglicano. Modificado de: Caparrós Rodríguez, 1992.



Ahora bien, la incorporación del peptidoglicano involucra la acción de diferentes enzimas como la autolisina, que permite generar un proceso de lisis entre monómeros de la pared, que facilita la integración de nuevas moléculas de peptidoglicano a la cadena. Una vez unidas por enlaces β -1,4 entre

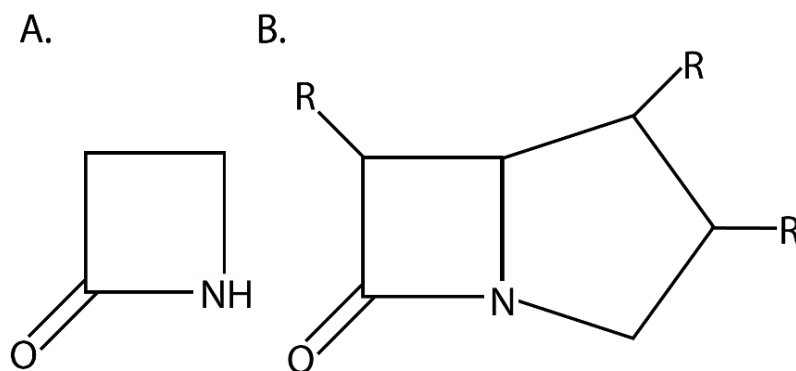
monómeros, la enzima transpeptidasa, se encarga de reforzar la estructura de la pared, generando enlaces cruzados entre péptidos.

2.2 Antibióticos betalactámicos

Actualmente se cuenta con un arsenal constituido por varias familias de antibióticos a los que *P. aeruginosa* es sensible, dentro de los cuales se destacan algunos betalactámicos; en este grupo se incluyen derivados de la penicilina, cefalosporinas, monobactámicos, carbacefem y carbapenémicos. La característica principal de este grupo es la presencia de un anillo betalactámico (Figura 2); una estructura compuesta por 3 carbonos, un nitrógeno y un grupo carbonilo unido al carbono beta (Vera-Leiva et al., 2017). Dentro de este grupo existen varias clases de antibióticos que presentan actividad contra *P. aeruginosa* como las cefalosporinas (como la ceftazidima cefoperazona y cefepime); ureidopenicilinas (azlocilina, piperacilina y mezlocilina), carbapenémicos (exceptuando al ertapenem) y monobactámicos (astreonam).

El mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos radica en la inhibición de la síntesis de la pared celular de mureína de las bacterias sensibles a estos antibióticos, es decir, son bactericidas.

Figura 2. Estructura química de los antibióticos beta-lactámicos. A) representación esquemática del anillo betalactámico. B) Representación de un betalactámico tipo carbapenémico. Modificado de: Suárez & Gudíol, 2009



Los antibióticos β -lactámicos son capaces de actuar sobre el recubrimiento de mureína inhibiendo la acción de la transpeptidasa, lo cual hace que se pierda consistencia de la pared celular. Adicionalmente, la pared sigue expuesta a la acción del resto de proteínas; incluyendo la autolisina, la cual genera un daño estructural a la pared al romper los enlaces entre monómeros; eventualmente la bacteria cede a la presión osmótica del medio extracelular, lo que conlleva a la lisis y posterior muerte celular.

Los antibióticos carbapenémicos son un grupo de betalactámicos con amplio espectro de actividad bactericida que han demostrado tener un grado alto de resistencia a las betalactamasas. Este grupo de antibióticos es considerado como las últimas líneas de defensa contra infecciones bacterianas. Existen 5 diferentes clases de carbapenemasas de tipo serina: SME, IMI, NMC, KPC y GES/IBC.

2.3 Resistencia a carbapenémicos

La resistencia antibiótica es la capacidad de un organismo de tolerar la presencia de un antibiótico específico mediante la acción de diversos mecanismos. Dicha resistencia se produce por selección natural a través de mutaciones producidas por azar, o por los diferentes mecanismos de transferencia horizontal de genes (transformación, conjugación y transducción) (Moreno M et al., 2009).

P. aeruginosa, por su parte, posee un arsenal de mecanismos que le confiere multiresistencia a un sinnúmero de antibióticos, dentro de los cuales se destacan la reducción del grado de expresión de porinas, sobre-expresión de las bombas de expulsión o la producción de β -lactamasas (Moreno M et al., 2009). Este último consiste en la producción de un grupo de enzimas que inhiben la acción de los betalactámicos, mediante la hidrólisis del anillo betalactámico.

KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), es una enzima carbapenemasa descrita por primera vez en Carolina del Norte (EEUU) en 1996 (Yigit et al., 2001), que posteriormente fue encontrada en

diferentes partes del mundo como India, China, y Sudamérica. El primer reporte de esta enzima en Colombia se dio en 2006 y un año después se reportó por primera vez en *P. aeruginosa* en este mismo país, un acontecimiento de gran importancia puesto que era la primera vez que se describía una bacteria portadora de KPC que no pertenecía a la familia enterobacteriaceae (Vera-Leiva et al., 2017). Esta enzima presenta actividad contra un amplio espectro de antimicrobianos β -lactámicos que incluye penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, aztreonam y carbapenémicos.

2.4 Elementos genéticos móviles

Un elemento genético móvil (EGM) hace referencia a un fragmento de ADN capaz de trasladarse de una parte del genoma a otra, ya sea entre regiones del cromosoma; entre el cromosoma y plásmidos presentes en la bacteria e incluso entre plásmidos. Estos elementos contribuyen a la transferencia horizontal de genes entre bacterias, junto con algunos otros mecanismos como los fagos y los elementos integradores. De este tipo de elementos destacan dos tipos; las secuencias de inserción (IS) y los transposones (Tn) (Bennett, 2004).

La mayoría de los EGM, están constituidos por un modelo simple, en donde el gen (*tnpA*) presenta un papel fundamental, puesto que codifica una proteína llamada transposasa, una enzima encargada de mediar la transposición. El proceso de transposición es netamente dependiente de la transposasa, puesto que esta se encarga de identificar el EGM, unirse a este, escindir los enlaces fosfodiéster y catalizar el proceso transportándolo a una nueva región de destino (Partridge et al., 2018).

2.5 Secuencias de inserción (SI)

Las secuencias de inserción son el EGM más simple, su estructura general consiste en un gen que codifica para una transposasa, y las llamadas IRs o repetidos invertidos, que como su nombre lo indica se trata de

secuencias cortas que se repiten en los extremos de la secuencia de inserción, esta región es la que la transposasa reconoce, y a la que se adhiere para llevar a cabo la transposición, ya que la configuración invertida de los extremos facilita que la transposasa se ubique de manera similar en ambos extremos del elemento. En algunos casos estas secuencias pueden poseer genes que codifican para resolvasas, enzimas encargadas del reordenamiento del ADN cuando se integra en la región de destino.

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

2.6 *Transposones (Tn)*

Los transposones (Tn) son EGM más complejos, y se definen como un elemento transponible que además de codificar para una transposasa, tiene genes asociados diferentes a los de la función de transposición. Normalmente, los genes asociados confieren a la bacteria una ventaja, ya sean genes que le faciliten desarrollar un mecanismo de patogenicidad o de resistencia bacteriana, estos últimos son los más estudiados puesto que tienen una importancia clínica, esta región recibe el nombre de gen estructural. En el caso de este estudio, el gen estructural es *bla_{KPC}*, una secuencia de ADN que codifica para la enzima KPC.

Los transposones habitualmente están compuestos por dos secuencias de inserción, que flanquean al gen estructural (transposones compuestos), estas se encargan de codificar para la transposasa que catalizara el proceso de transposición, los IRs de los extremos en las secuencias de inserción son reconocidos por

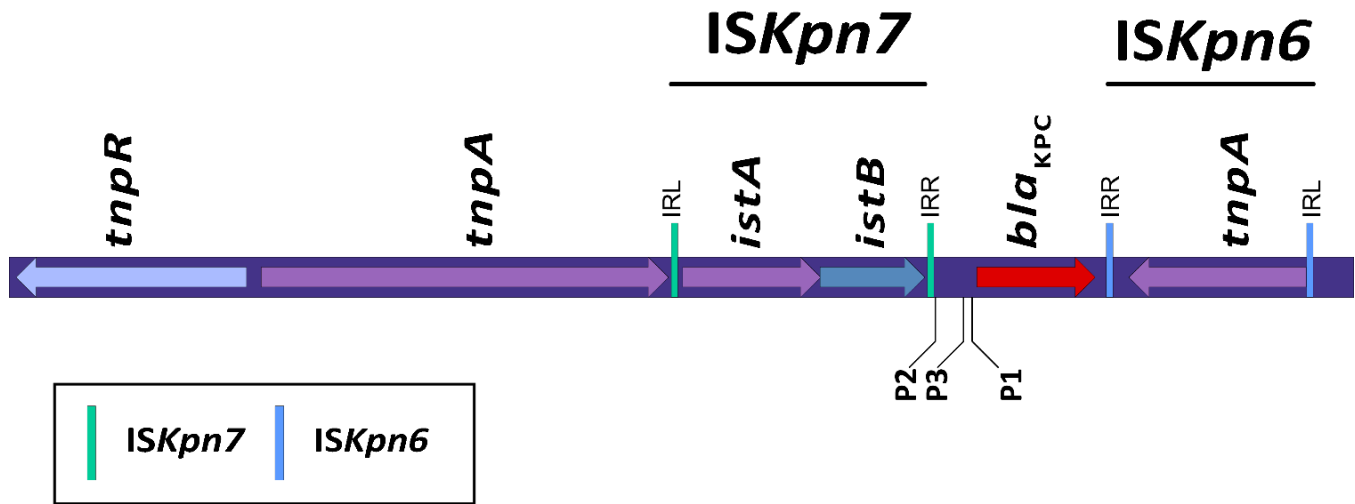
la transposasa y el proceso ocurre de la misma forma que en el caso de una secuencia de inserción ordinaria (Partridge et al., 2018).

2.6.1 *Tn4401*

Este es el nombre del principal transposón asociado al gen *bla_{KPC}*, este está compuesto por una secuencia que codifica para una transposasa (*tnpA*); una resolvasa (*tnpR*); las secuencias de inserción *ISkpn7* e *ISkpn6* con sus respectivos IR que en el caso del *Tn4401* son imperfectos y tienen un tamaño aproximado de 39 pb; el gen *bla_{KPC}* y está flanqueado por repetidos en el sitio de inserción (Target Site Duplications, TSD); estas últimas regiones corresponden a unos fragmentos de ADN que son “vestigios” de la zona donde se insertó el transposón, en el caso de *Tn4401* corresponden a fragmentos de 5pb (Barría-Loaiza et al., 2016; Cuzon et al., 2011).

A la fecha, se han descrito 8 isoformas de este transposón, designadas con letras de la “a” a la “h”; la isoforma que se cree es la más completa es la *Tn4401b*, la cual tiene un tamaño aproximado de 10 Kb, el resto difieren de ésta por deleciones que han sufrido probablemente en los procesos de transposición, por lo que cada isoforma tiene un tamaño diferente y menor al de la isoforma “b” (Cuzon et al., 2011). Finalmente, se debe tener presente que el *Tn4401* es un transposón altamente activo que no posee especificidad en su región de destino, de modo que no requiere de una secuencia específica para su incorporación en la región *blanco* (L. Chen, Mathema, et al., 2014; Nordmann et al., 2012).

Figura 3. Representación de la estructura general del transposón Tn4401b generada a partir del análisis de su secuencia obtenida del NCBI (número de acceso: KM983022.1). Figura elaborada con Easyfig.



La forma en la que este realiza la transposición es replicativa, esto hace referencia a que el transposón puede aumentar el número de copias presente en el genoma mediante la replicación de los extremos 3' del genoma aceptor; de modo que una copia se queda en la región donde inicialmente se encontraba y la segunda se dirige a la región objetivo y se integra ahí. La duplicación del transposón se da gracias a la formación de un cointegrado, es decir, la fusión del transposón y la región donde se transpone.

El Tn4401 fue el primer responsable de la diseminación de KPC, sin embargo, en los últimos años se ha reportado la circulación de otros elementos no relacionados a este transposón (NTE_{KPC}). Los reportes de estos nuevos elementos cada vez son más frecuentes y se han ampliado a diferentes especies bacterianas.

2.6.2 NTE_{KPC}

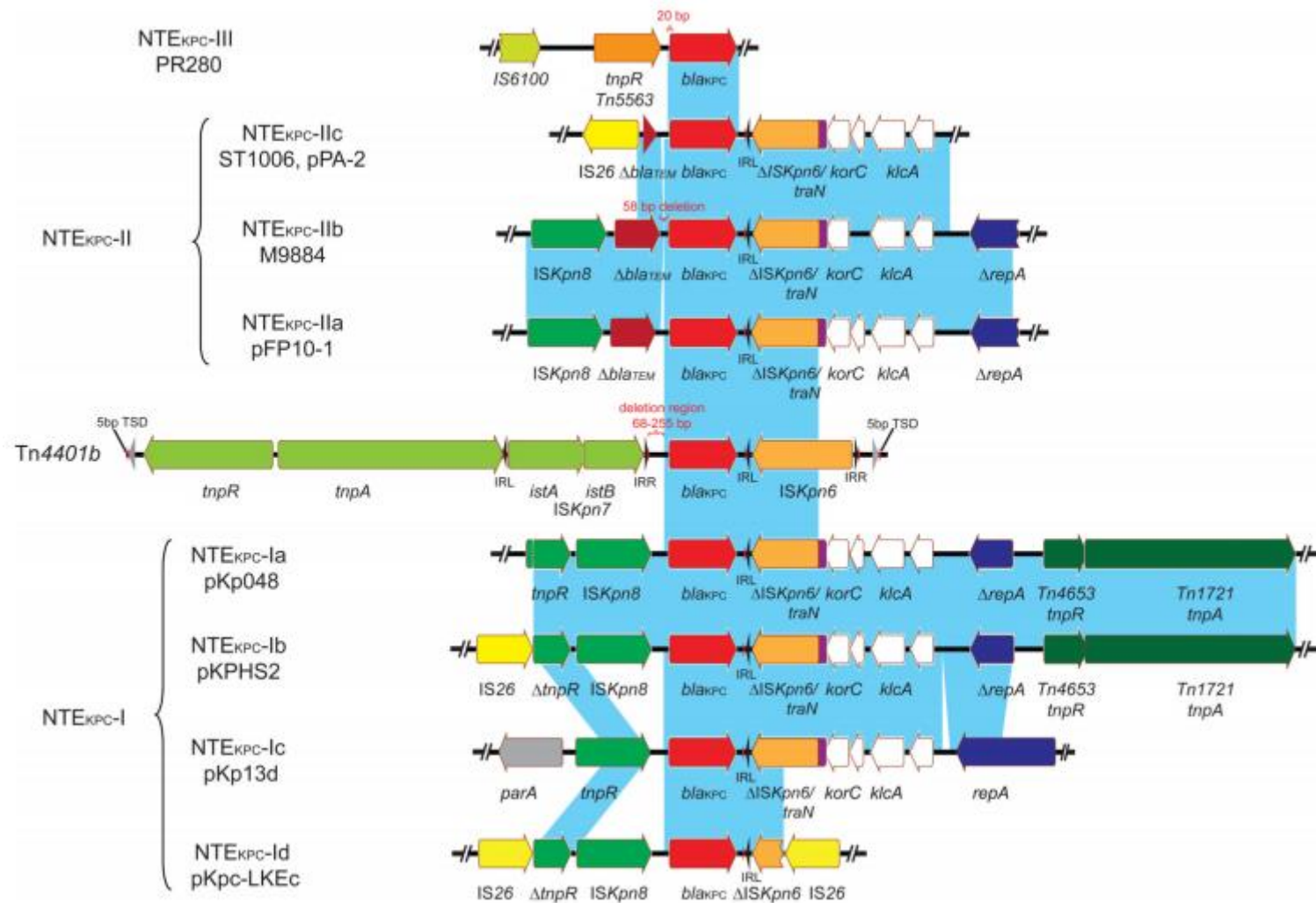
Este término hace alusión fundamentalmente a los elementos transponibles que participan en la movilización de bla_{KPC} , que difieren del transposón del Tn4401, de hecho, su nombre hace referencia a elementos no Tn4401 (“Non-Tn4401 Elements”), este tipo de elementos han sido encontrados ampliamente en *Klebsiella pneumoniae* (Cerqueira et al., 2019). Sin embargo, la presencia de estos

elementos demuestra que existen otros mecanismos asociados a la transposición de este gen que pueden contribuir al éxito de diseminación en otras bacterias como *P. aeruginosa* (Souza et al., 2019).

Los NTE_{KPC} presentan similitudes con el Tn4401, por ejemplo, en el caso de las variantes NTE_{KPC}- I y NTE_{KPC}- II presentes en *Klebsiella pneumoniae*, poseen una secuencia $\Delta ISkp\eta 6$ corriente abajo del gen *bla*_{KPC} en sus respectivas estructuras; secuencia de inserción característica del transposón Tn4401, lo que ha sugerido que algunas NTE_{KPC} pudieron evolucionar a partir de una isoforma del Tn4401, o que tienen un origen común con este transposón (L. Chen, Mathema, et al., 2014).

La nomenclatura de los NTE_{KPC} obedece a las inserciones presentes en la región corriente arriba del gen *bla*_{KPC}. Si no presenta ninguna inserción, corresponde a un NTE_{KPC}-I; si presenta una inserción de un *bla*_{TEM} es considerado un NTE_{KPC}-II; y los NTE_{KPC}-III poseen una inserción de Tn5563/IS6100.

Figura 4. Alineamientos pareados de las secuencias NTE_{KPC} (reportadas hasta el 2014) en contraste con el transposón Tn4401b. Imagen tomada de Chen, Mathema, et al., 2014.



3 Justificación

Los Elementos genéticos móviles son secuencias de ADN que pueden trasladarse a otra región del ADN o transponerse a plásmidos conjugativos que contribuyen a la transferencia horizontal de genes; una de las principales causas de propagación de la resistencia a antimicrobianos (Bennett, 2004).

KPC es una carbanemasa descubierta en 1996 en Carolina del norte en *K. pneumoniae* codificada por el gen *bla*_{KPC}. Inicialmente su circulación se restringió a *K. pneumoniae* y otras enterobacterias, sin embargo, en 2007 se reportó por primera vez la presencia de esta enzima en *P. aeruginosa* en Colombia (Villegas et al., 2007), siendo a su vez el primer registro de KPC en un organismo no perteneciente a las enterobacterias. El mecanismo responsable de la incorporación del gen en este plásmido fue el transposón Tn4401, el cual en la actualidad es el principal responsable de la diseminación de este gen hacia nuevas estructuras genéticas (Naas et al., 2008).

La presencia de *bla*_{KPC} en *P. aeruginosa* se ha convertido en un problema de salud pública; pues este le provee resistencia contra carbapenémicos y otros β -lactámicos (Cuesta et al., 2012). Se debe recalcar que *P. aeruginosa* es uno de los principales causantes de casos de neumonía en ambientes hospitalarios generados en pacientes de alto riesgo, siendo considerado una de las causas más frecuentes de infecciones oportunistas en humanos y es la causa más común de infecciones respiratorias persistentes (Winstanley et al., 2009). Por lo que, la adquisición de nuevos genes de resistencia aumenta la dificultad de tratamiento y pone en riesgo el desenlace de los pacientes afectados por este microorganismo. Adicionalmente, en los últimos años el gen *bla*_{KPC} se ha reportado en elementos genéticos no convencionales (NTE_{KPC}) en *K. pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica serovar*,

Pseudomonas aeruginosa y *Enterobacter cloacae* (de Lima et al., 2020), lo que puede tener implicaciones para la capacidad de diseminación horizontal de este gen.

Recientemente, en un trabajo realizado en cooperación entre la Universidad Nacional y el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque (LGMB), se analizaron 23 aislamientos de *P. aeruginosa* obtenidos a partir de un estudio observacional descriptivo de tipo corte transversal en cuatro hospitales de tercer nivel de complejidad, en la ciudad de Bogotá, entre enero de 2017 y agosto de 2018. Los 23 aislamientos fueron confirmados como *P. aeruginosa* y portadores *bla*_{KPC}. Adicional a esto, se realizó una macro-restricción del genoma y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE).

En este estudio, fue establecido el genoma completo del aislamiento 34Pae23 mediante técnicas de secuenciación de tercera generación (PacBio), dado que presentaba mayor variabilidad en la relación genética con respecto al resto de aislamientos y se buscaba profundizar en sus características genéticas. Los análisis preliminares sugirieron que el gen *bla*_{KPC} se encuentra en un ambiente genético tipo NTE_{KPC}. El tamaño del cromosoma del aislamiento 34Pae23 corresponde a 6.870.367 pb, además de presentar un plásmido (p34Pae23) de 42.977 pb que alberga el gen *bla*_{KPC}.

Durante este mismo estudio realizado por el LGMB se encontró que 17 de los aislamientos (73.91 %) presentaron *bla*_{KPC-2}. Los aislamientos restantes presentaron *bla*_{KPC-3} o no se pudo determinar la variante de este gen que estos aislamientos albergaban. Los aislamientos que mostraron *bla*_{KPC-3} fueron el 34Pae19 y 34Pae36. Esto es importante, dado que las variantes 2 y 3 del gen *bla*_{KPC} frecuentemente representan una amenaza, siendo los responsables de brotes epidémicos, además de ser las variantes más comunes en aislamientos de tipo clínico (Lee et al., 2016). Adicionalmente *bla*_{KPC-2} es considerada la variante predominante en el mundo, aunque *bla*_{KPC-3} se ha establecido en diferentes nichos de diferentes países

como Estados Unidos, Israel y algunos países de América Latina (L. F. Chen et al., 2012). Históricamente *bla*_{KPC-2} ha tenido una prevalencia mayor en Colombia, dado que su primer reporte se dio en 2006; por otra parte *bla*_{KPC-3} se reportó por primera vez en el país 5 años después (Lopez et al., 2011). Y la presencia de ambas variantes ha hecho que los aislamientos portadores de KPC sean considerados un problema endémico del País. Curiosamente, los aislamientos portadores de *bla*_{KPC-3} se encontraban en la misma institución (Institución 4) pero en clones distintos, lo que sugiere que se pudo dar un evento de movilización horizontal entre clones. Por lo que en este estudio se busca esclarecer el rol de los diferentes EGM asociados a *bla*_{KPC} presentes en estos aislamientos.

4 Preguntas de Investigación

¿Cuáles son los elementos transponibles involucrados en la movilización del gen *bla*_{KPC} diferentes del transposón Tn4401 (NTE_{KPC}) en el aislamiento 34Pae23 de *P. aeruginosa* y cómo pudieron haber contribuido para la movilización de dicho gen?

¿Qué relación presentan los elementos NTE_{KPC} descritos en el aislamiento 34Pae23 con los reportados previamente en *K. pneumoniae* y otras bacterias?

5 Objetivos del proyecto

5.1 Objetivo general

Caracterizar los elementos genéticos transponibles NTE_{KPC} en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* reportado en Colombia y establecer la frecuencia de estos elementos en una cohorte de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*.

5.2 Objetivos específicos

1. Realizar un análisis genómico comparativo para la caracterización de los elementos NTE_{KPC} involucrados en la movilización del gen *bla*_{KPC} en un aislamiento clínico colombiano de *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Caracterizar la región que flanquea corriente arriba el gen *bla*_{KPC} en un grupo de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* para establecer la frecuencia de circulación de elementos NTE_{KPC} en esta especie.

6 Métodos

Este trabajo de grado se encuentra dividido en dos fases; la fase *In Silico*, que tiene como objetivo el análisis y caracterización de los elementos genéticos móviles de la secuencia de un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* que mediante análisis previos demostró ser bla_{KPC} positivo. Y que presenta un posible NTE_{KPC} que no ha sido reportado previamente. La segunda fase, consistió en el análisis experimental de una cohorte de aislamientos bla_{KPC} -positivos de *Pseudomonas aeruginosa*, para caracterizar la región que flanquea corriente arriba el gen bla_{KPC} , para establecer la frecuencia de circulación de elementos NTE_{KPC} en esta especie en Bogotá, Colombia.

Inicialmente este análisis se realizaría en 23 aislamientos de 4 instituciones. No obstante, dado a los avances en el desarrollo de este trabajo de grado fue posible incluir aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* KPC positivos adicionales, de modo que se mantuvo la naturaleza del proyecto y se expandió el análisis. Estos corresponden a 38 aislamientos obtenidos en una quinta institución, y que fueron obtenidos entre enero de 2017 y junio de 2020. En estos aislamientos no se realizó la caracterización por pulsotipos mediante PFGE.

6.1 Metodología de la fase in silico

6.1.1 Caracterización de la región NTE_{KPC} del aislamiento clínico de *P. aeruginosa* 34Pae23

Se partió del genoma del aislamiento clínico de *P. aeruginosa* 34Pae23, previamente secuenciado, ensamblado y circularizado en el LGMB. El genoma y el plásmido fueron anotados mediante el uso del programa Prokka v1.11 con el objetivo de establecer los marcos abiertos de lectura (ORF) y sus posibles funciones (Seemann, 2014). Una vez completada la anotación, se realizó la curación manual de las regiones de interés mediante el uso de Artemis, Artemis Comparison Tool (ACT), BLASTn y BLASTp,

para determinar con mayor exactitud la función de los ORF (Altschup et al., 1990; Carver et al., 2005). Durante la curación, los genes de resistencia a antibióticos fueron identificados usando ARIBA con las bases de datos ResFinder, ARG-ANNOT, CARD y MEGARes (Gupta et al., 2014; Hunt et al., 2017; Jia et al., 2017; Lakin et al., 2017; Zankari et al., 2012). Los elementos genéticos móviles, tales como, transposones y secuencias de inserción fueron identificadas mediante el uso de bases de datos como The Transposon Registry, ISfinder y BLASTn (Altschup et al., 1990; Siguier et al., 2012; Tansirichaiya et al., 2019).

Una vez identificados los EGM y genes de resistencia antibiótica en la secuencia del plásmido p34Pae23 (plásmido identificado en el aislamiento 34Pae23), se realizaron comparaciones pareadas de la región adyacente al gen *bla_{KPC}* en el aislamiento de estudio, con otros entornos genéticos del gen *bla_{KPC}* reportados en otras bacterias y disponibles en la base de datos de nucleótidos del NCBI, con el fin de establecer posibles relaciones entre el aislamiento analizado en este estudio con los previamente reportados. Dentro estas secuencias previamente reportadas se utilizaron nueve diferentes NTE_{KPC} clasificados en tres tipos (*Tabla 1*).

Los alineamientos pareados fueron desarrollados y graficados para generar las imágenes correspondientes usando EasyFig (Sullivan et al., 2011), mostrando las similitudes entre sí. El mismo procedimiento se realizó utilizando a las variantes del Tn4401.

6.1.2 *Diseño de cebadores*

Mediante el uso de la plataforma Primer BLAST del NCBI (Ye et al., 2012), se diseñaron varios conjuntos de cebadores, que tenían como objetivo amplificar la región corriente arriba del gen *bla_{KPC}* de los aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Para su diseño, se tuvieron en cuenta los

parámetros del tamaño del amplicón generado (≥ 300 - ≤ 1000); el contenido GC(Guanina-Citosina) (entre el 40% y 60%); Temperatura de Melting ($T^{\circ}m$) (entre el 55 °C y 65 °C, y que tuvieran diferencias inferiores a 3°C entre los cebadores sentido y anti-sentido), longitud de los cebadores (entre 16 pb y 25 pb), baja formación de dímeros y no complementariedad en el extremo 3' que pueda bloquear el proceso de extensión de la DNA polimerasa.

6.2 Metodología del análisis experimental

6.2.1 Estandarización de las PCR diseñadas Amplificación de la región corriente arriba del gen *bla_{KPC}* para la caracterización de los elementos genéticos transponibles.

Se realizó su estandarización mediante PCR convencional para establecer las mejores condiciones en las que se da la reacción. Para esto, se hizo una disolución del ADN de las muestras a 16 µg/mL y se estableció el tiempo de extensión dependiendo del tamaño de los amplicones. Además, se diseñó una PCR en gradiente para establecer la $T^{\circ}m$ indicada para el correcto funcionamiento de los cebadores

6.2.2 Controles para la ejecución de las PCR

El aislamiento 34Pae36 fue utilizado como control positivo para la PCR del Tn4401 (cebadores GN790 y GN791), este aislamiento fue secuenciado previamente y se había confirmado la presencia del Tn4401b en su estructura.

En el caso de la PCR específica para NTE_{KPC}-II (cebadores GN790-GN793) se utilizaron dos controles positivos: el aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* 34Pae23, el cual posee el NTE_{KPC}-II_f (identificado, caracterizado y clasificado en este trabajo) y el aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* 33Kpn12 el cual posee el NTE_{KPC}-II_e en el plásmido p33Kpn12-KPC (Código de acceso para GenBank: CP062794.1), y como control negativo el aislamiento 34Pae36, ya que este posee un transposón Tn4401 y se pretendía verificar que los cebadores fueran específicos.

En el caso de la PCR que amplifica para el NTE_{KPC}-III (cebadores GN790-GN794), no se pudo emplear ningún control, dado a que en Colombia no se ha identificado ninguna cepa que contenga este elemento en su estructura y no se pudo contactar a ningún investigador que pudiera proporcionar el ADN para usarlo como control positivo. Por el contrario, para la PCR empleada para la identificación de los NTE_{KPC}-I (cebadores GN790-GN794) se utilizó el plásmido pKPC-LK-30 (Numero de acceso para GenBank: KC405622.1), el cual fue reportado en Taiwán. Este ADN fue amablemente donado por el Dr. Kristopher Siu, la Dra. Yu Kuo y su grupo, para el desarrollo del presente trabajo (Y.-T. Chen et al., 2014). Una vez realizado esto, se procedió a caracterizar la región corriente arriba del gen *bla*_{KPC}, mediante el uso de las PCR's estandarizadas; en los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* empleando los controles y las condiciones establecidas.

6.2.3 *Determinación de la frecuencia de regiones NTE_{KPC} en una cohorte de aislamientos clínicos de Pseudomona aeruginosa*

El laboratorio cuenta con un cepario de bacterias almacenadas en crioviales a -80°C para su preservación. De los cuales se recuperaron las bacterias mediante cultivo en medio LB agar y posteriormente se realizó la extracción del ADN total de las muestras mediante el método de fenol-cloroformo (Wright et al., 2017), y purificación con Etanol al 70%. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 50 µL de agua grado biología molecular.

Utilizando los oligonucleótidos diseñados, se ejecutaron las PCR para evaluar el entorno genético de los aislamientos y clasificarlos como NTE_{KPC} (ya fuera I, II o III) o como una variante del Tn4401. Con los resultados obtenidos se reportó la frecuencia de circulación de dichas estructuras no convencionales en *P. aeruginosa*.

Las electroforesis para poder evaluar los productos de PCR se realizaron usando un voltaje de 100V por 1 hora. Los geles fueron fabricados usando agarosa al 1% en buffer TBE 1X en todos los casos exceptuando el de la PCR para NTE_{KPC}-II, en donde se usó una concentración de 1.8% de agarosa para mejorar la resolución de los productos de menor tamaño. Los productos de PCR fueron teñidos con Bromuro de Etidio (0.01 μ g/mL) y visualizados en un fotodocumentador ChemiDoc XRS de BioRad.

7 Resultados

7.1 Análisis genómico del aislamiento 34Pae23

7.1.1 Determinación de los marcos abiertos de lectura del plásmido p34Pae23

El análisis genómico del aislamiento 34Pae23 permitió identificar un cromosoma de 6'870.367 pb y un plásmido (p34Pae23) de 42.977 pb. Una vez anotado el genoma se encontraron 6391 marcos abiertos de lectura (ORF, open Reading frames) en el cromosoma y 52 en el plásmido p34Pae23. Mediante la plataforma ResFinder (Bortolaia et al., 2020) se encontró que 11 de esos ORFs corresponden a genes de resistencia antibiótica (Anexo 1); de los cuales 8 de ellos se presentaron en el cromosoma, que están asociados a la resistencia a aminoglicósidos, sulfonamidas, quinolonas, fosfomicina y betalactámicos (Anexo 1). En el plásmido se encontraron 3 genes de resistencia, *bla*_{TEM}, *aac(6')-29b* y *bla*_{KPC-2}, codificando resistencia para betalactámicos y aminoglicósidos.

7.1.2 Análisis de las plataformas asociadas a la movilización de *bla*_{KPC}

La secuenciación del aislamiento 34Pae23 reveló que el gen *bla*_{KPC} se encuentra en el plásmido p34Pae23 y no en el cromosoma del aislamiento. En la región corriente abajo del *bla*_{KPC} se encontraron vestigios de la transposasa (*tnpA*) de la *ISKpn6*; una región característica del transposón Tn4401 (Figura 3).

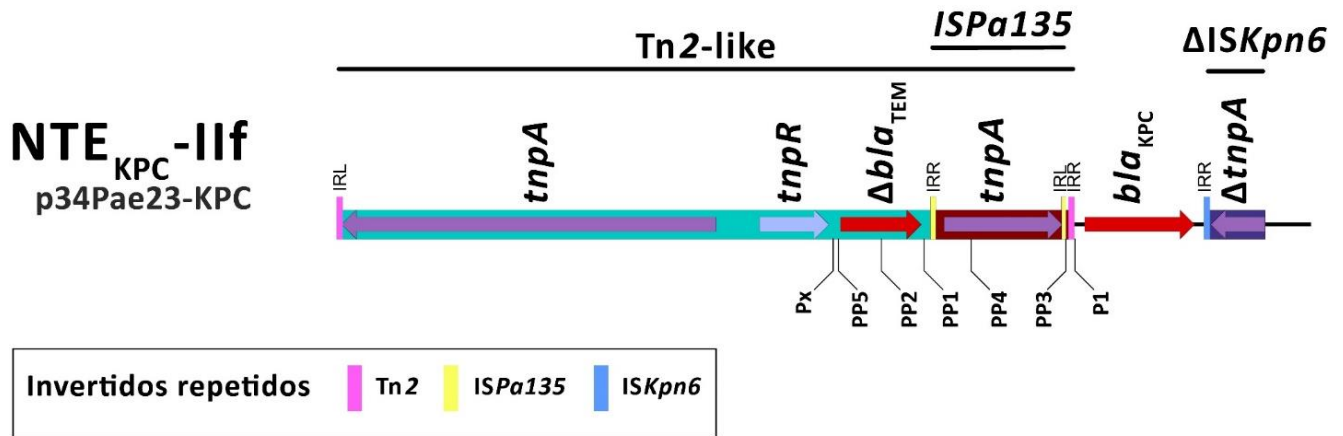
En la región corriente arriba de *bla*_{KPC} se encontraron genes no asociados al Tn4401, tales como una secuencia de inserción de la familia IS30 que presentó un 99% de identidad con la *ISKmi1* reportada en ISfinder, sin embargo, no fue idéntica a ninguna IS presente en esta base de datos, por lo que se caracterizó como una nueva IS y fue reportada por el LGMB con el nombre *ISPa135*.

Adicionalmente, se encontró otro determinante de resistencia a betalactámicos correspondiente a un *bla*_{TEM} que se encontraba truncado, la variante alélica de este gen fue imposible de determinar debido a

su región faltante. No obstante, es de destacar que algunos NTE_{KPC} poseen esta característica, aunque a diferencia de las demás variantes que comparten esta característica, este gen no se encuentra inmediatamente corriente arriba del *bla*_{KPC} (Figura 7). Finalmente, este elemento también contiene una resolvasa (*tnpR*) y transposasa (*tnpA*) que tienen una identidad de 99% y 95%, respectivamente, con la resolvasa y transposasa del transposón Tn2; un híbrido con este transposón podría explicar la presencia del *bla*_{TEM} en la estructura del elemento (Figura 5).

El análisis de la *ISKpn6* corriente abajo de *bla*_{KPC}, mostro que este elemento esta truncado, generando la pérdida del marco de lectura de la *tnpA* y el IR corriente arriba de este (Figura 5), en consecuencia, este elemento no está implicado en la transposición del gen *bla*_{KPC}.

Figura 5. Análisis del elemento NTE_{KPC} presente en el plásmido p34Pae23. Los genes y sus orientaciones de codificación se indican mediante flechas horizontales. Los rectángulos que se extienden de forma horizontal delimitan los transposones o IS y los elementos que los componen. Un color diferente significa un elemento genético móvil diferente. Las barras alargadas verticalmente muestran los repetidos invertidos (IRs) que delimitan a los EGM; los IRL (Inverted Repeat Left) e IRR (Inverted Repeat Right) del Tn2-like son idénticos a los del Tn2. Las regiones promotoras se indican con la letra P o PP para promotores putativos.

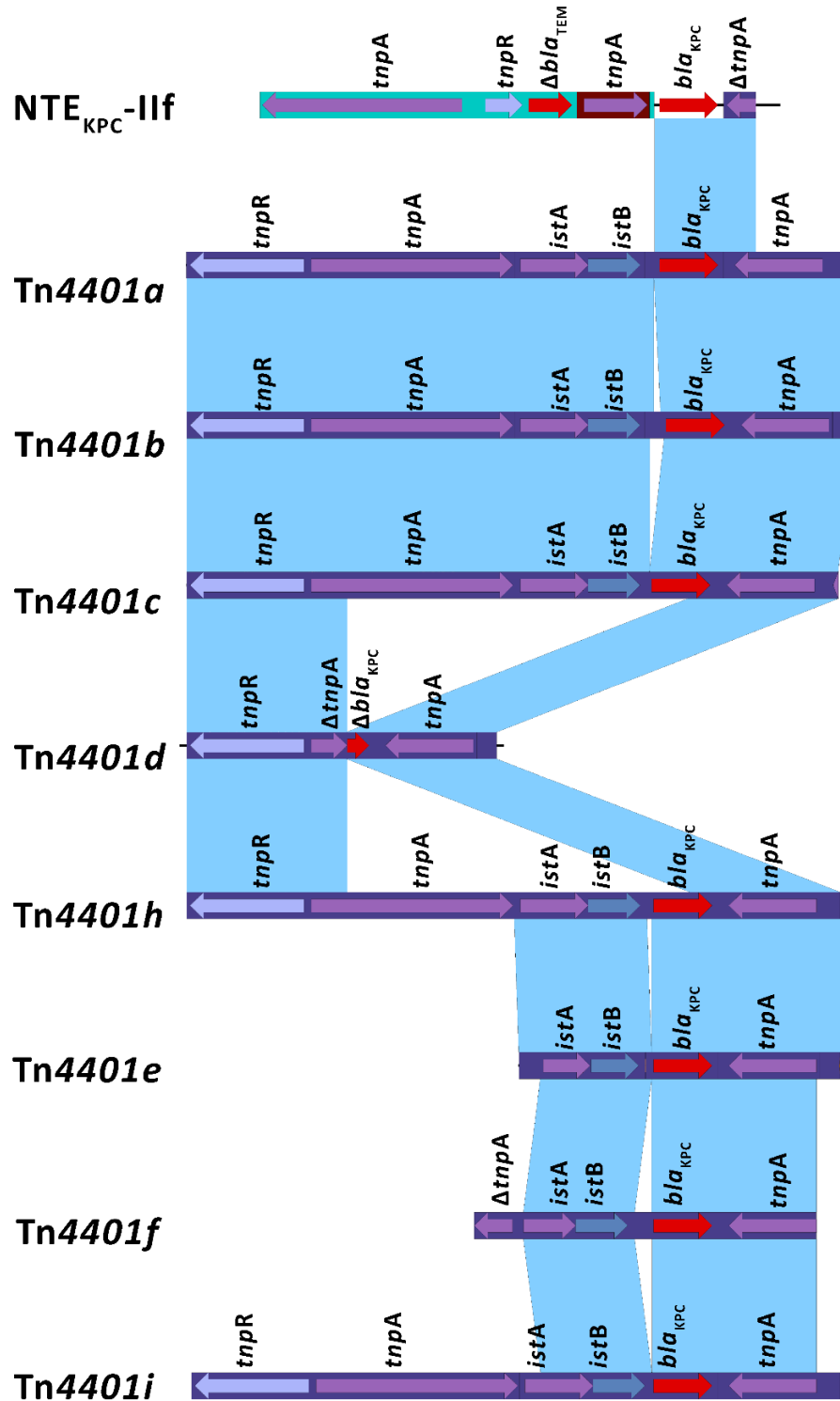


7.1.3 Comparación de las plataformas de movilización Tn4401 reportadas con el elemento *NTE_{KPC}* presente en p34Pae23

Con el objetivo de corroborar si la plataforma genética asociado al gen *bla_{KPC}* en el plásmido p34Pae23 presenta similitudes con el Tn4401, se compararon sus secuencias mediante BLAST por alineamientos pareados generados en EasyFig (Carattoli et al., 2005; Sullivan et al., 2011). Se encontró que la región compartida entre ambas secuencias corresponde al *bla_{KPC}* y una *ISKpn6* que para el caso del p34pae23 se encuentra truncada, con una delección de 840pb; no obstante, la región remanente se mantuvo intacta, ya que presenta 100% identidad con respecto a la misma región en el Tn4401 (Figura 6). Estos resultados sugieren que el *bla_{KPC}* y la *ISKpn6* son provenientes de una variante del Tn4401. La región mencionada, corresponde a 1518pb (18% de cobertura del Tn4401b); esta región inicia 73 pb corriente arriba de *bla_{KPC}* y finaliza cuando se trunca la *ISKpn6* (

Figura 6), no obstante, no se encontró ninguna otra región vestigial del Tn4401 en el plásmido p34Pae23.

Figura 6. Comparación mediante alineamientos pareados entre el NTE_{KPC}-IIf identificado en este estudio con las diferentes variantes del Tn4401 (a-i), considerada la principal plataforma de diseminación de *bla*_{KPC}. Los genes y sus orientaciones de codificación se indican mediante flechas horizontales, estos se encuentran encerrados en recuadros de colores que indican los



límites de los diferentes Tn e IS que conforman. Las regiones compartidas (identidad >99%, en ventanas de análisis de 300bp) entre las estructuras son representadas en azul.

7.1.4 Comparación de los NTE_{KPC} reportados con el elemento NTE_{KPC} presente en p34Pae23

Posterior a esto, se realizó una búsqueda en la base de datos del NCBI para encontrar los NTE_{KPC} reportados hasta la fecha (Nov, 2021) (Tabla 1) y se realizaron alineamientos pareados para compararlos entre sí. Uno de los rasgos compartidos entre los diferentes NTE_{KPC} encontrados mediante este análisis, consiste en una región corriente abajo del *bla*_{KPC} que corresponde a la *ISKpn6*, remanente del Tn4401; lo que sugiere que todos los NTE_{KPC} han surgido a partir de la fusión de Tn4401 con otros elementos genéticos. En la mayoría de estos elementos dicha IS se encuentra truncada y no es funcional.

Tabla 1. Elementos NTE_{KPC} reportados hasta la fecha (Nov, 2021). Modificada y actualizada de Chen, Mathema, et al en 2014.

| Nombre | acceso | Cepa | Plásmido* | Organismo |
|--------------------------|--------------|----------|--------------|-------------------------------|
| NTE _{KPC} -Ia | KF826292.1 | HS10505 | pHS10505 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| NTE _{KPC} -Ib | CP003224.1 | HS11286 | pKPHS2 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| NTE _{KPC} -Ic | KC788405.1 | LK-NARMP | pKPC-LKEc | <i>Escherichia coli</i> |
| NTE _{KPC} -Id | CP003997.1 | Kp13 | pKP13d | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| NTE _{KPC} -IIa | HQ651092.1 | fp10 | pFP10-1 | <i>Klebsiella oxytoca</i> |
| NTE _{KPC} -IIb | JN048639.1 | M9169 | ND | <i>Citrobacter freundii</i> |
| NTE _{KPC} -IIC | KC609322.1 | ST1006 | pPA-2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| NTE _{KPC} -IId | MH595533.1 | KPN535 | pKPN535a | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| NTE _{KPC} -IIe | CP062794.1 | 33Kpn12 | p33Kpn12-KPC | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| NTE _{KPC} -IIIf | Este estudio | 34Pae23 | P34Pae23 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| NTE _{KPC} -III | EU400222.2 | PR280 | ND | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |

*ND = No Determinado.

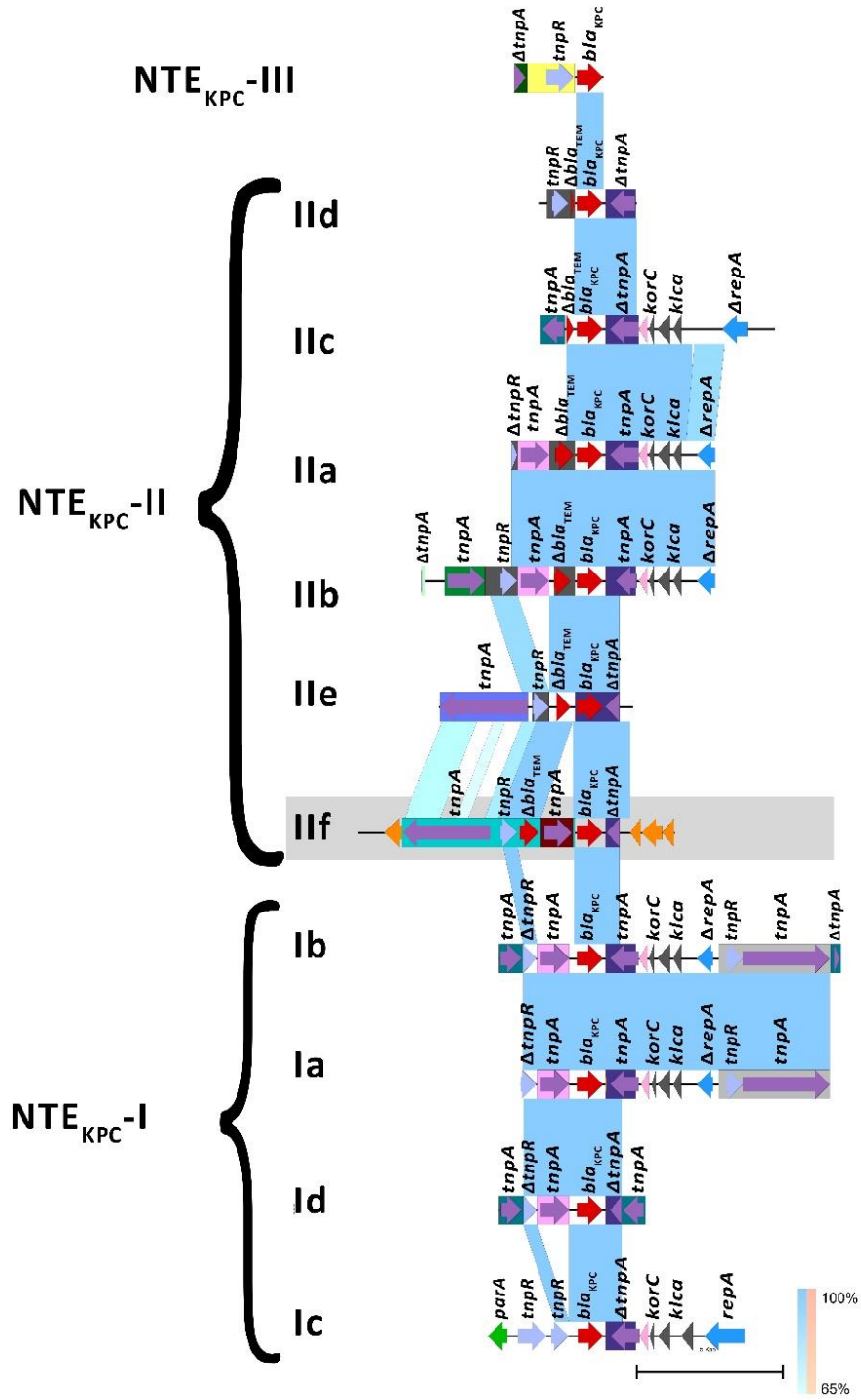
Los elementos NTE_{KPC} han sido clasificados en tres grupos (I-III). Existen características distintivas de cada grupo de NTE_{KPC}. Por su parte, los NTE_{KPC}-I son provenientes de la quimera Tn3-Tn4401, puesto

que corriente arriba del gen *bla*_{KPC} presentan restos de un gen *tnpA* de la familia Tn3 (Huang et al., 2019). Los elementos NTE_{KPC}-II poseen un *bla*_{TEM} (o remanentes), corriente arriba del gen *bla*_{KPC}. Es probable que este gen *bla*_{TEM} provenga de un Tn3, en donde se encuentra frecuentemente. Los NTE_{KPC}-III poseen inserciones de Tn5563/IS6100. Este subgrupo no parece tener un origen común con los otros dos tipos de variantes de NTE_{KPC}.

La presencia de *bla*_{TEM} es el diferenciador que define al grupo NTE_{KPC}-II, una característica presente en el elemento del p34Pae23 (Figura 6), por consiguiente, dicho elemento se puede catalogar como un NTE_{KPC}-II. Así, según los reportes generados a la fecha y siguiendo con la numeración consecutiva establecida por Chen et al., 2014, este nuevo elemento se clasificó como el NTE_{KPC}-IIf.

No obstante, a diferencia de los elementos NTE_{KPC} reportados previamente, el NTE_{KPC}-IIf corresponde a una quimera Tn4401-Tn2 ya que el EGM que transporta el *bla*_{TEM} y que se encuentra corriente arriba del gen *bla*_{KPC}, presenta alta relación con la familia de transposones Tn2. Dicho elemento muestra regiones compartidas de homología en la resolvasa corriente arriba del Δ *bla*_{TEM} con los NTE_{KPC}-I y NTE_{KPC}-II (100 % de identidad). Esto se debe principalmente a que el Tn3 y el Tn2 son transposones que comparten un 97% de identidad y ambos se clasifican dentro de la familia Tn3 de transposones.

Figura 7. Comparación esquemática del elemento NTE_{KPC}-IIf (elemento resaltado en un recuadro gris, ya que está presente en el aislamiento evaluado en este estudio) y los diferentes subgrupos conocidos de los NTE_{KPC} (Non Tn4401 Elements). Los genes son representados por flechas de colores; los recuadros rectangulares de colores indican los límites de los diferentes Tn e IS a los que pertenecen. Las barras de secuencia azul indican áreas de identidad (evaluadas usando una ventana de 300 pb). Dentro de los NTE_{KPC} conocidos se reconocen tres grupos: I, II y III (Huang et al., 2019).



7.1.5 Análisis de los promotores de *bla_{KPC}* en el *NTE_{KPC}-IIf*

El análisis del entorno genético de *bla_{KPC}* reveló la presencia de un transposón corriente arriba de este gen. Dado que esta inserción pudo alterar las regiones promotoras de este gen, se realizó un análisis para identificar estas estructuras y su posible impacto sobre la capacidad de expresión de la β-lactamasa KPC. Según lo reportado, en el *Tn4401*, *bla_{KPC}* posee tres regiones promotoras conocidas como P1, P2 y P3 (Figura 3) (Huang et al., 2019). En el caso del *NTE_{KPC}-IIf*, la inserción del Tn2-like generó la pérdida de las regiones P2 y P3, pero incorporó cinco regiones promotoras putativas (PP1-5) y una región promotora Px (Tabla 2).

Tabla 2. Regiones promotoras corriente arriba de *bla_{KPC}* encontradas en el *NTE_{KPC}-IIf* presente en el plásmido p34Pae23. Las secuencias promotoras se identificaron por búsqueda manual de secuencias reportadas previamente o mediante el uso del software BPROM (Solovyev, 2011). Únicamente las regiones P1 y Px tienen evidencia experimental de su actividad promotora.

| Código | Secuencia -35 | Secuencia -10 | Secuencia +1 | Referencia |
|--------|---------------|---------------|--------------|--------------------|
| Px | TTCAAA | TGAGACAAT | G | Huang et al., 2019 |
| PP5 | CTGATA | TTGAAAAT | NA | Este estudio |
| PP2 | TAGCTT | TAATAGACT | NA | Abril et al., 2021 |
| PP1 | TTGATT | TTTTAATTT | NA | Abril et al., 2021 |
| PP4 | TTTTTCG | CCGCAGACT | NA | Este estudio |
| PP3 | TTGAAT | TGATAATCT | NA | Este estudio |
| P1 | TAATCC | TTACAT | G | Naas et al., 2012 |

El promotor Px, ha sido previamente reportado en una quimera *Tn4401*-*Tn3* (Huang et al., 2019), la cual, según el estudio es la principal diseminadora de *bla_{KPC}* en China. Los promotores PP1 y PP2, fueron encontrados y reportados por el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana (LGMB) en el *NTE_{KPC}-IIf*, encontrado en el aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* 33Kpn12 (Abril et al., 2021), al igual que en

este estudio, el promotor PP2 se encontró sobre el gen *bla*_{TEM} y PP1 en la región entre los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{KPC}.

Por otra parte, los promotores PP3, PP4 y PP5; fueron encontrados en este estudio y su nombre se le otorgo siguiendo la nomenclatura establecida por el LGMB y empleada en el estudio en el que se reportaron PP1 y PP2 (Abril et al., 2021), haciendo alusión a promotores putativos.

La región PP4 se encuentra en la *ISPa135*. La región PP3, por su parte, se formó gracias a la inserción de la *ISPa135* en el elemento Tn2-like, dado que la caja -35 del promotor se encuentra sobre la IRL de esta secuencia de inserción y la caja -10 se encuentra en una secuencia del Tn2-like (Figura 8). La región PP5 no fue encontrada en otras secuencias NTE_{KPC}-II, dado que el Δ *bla*_{TEM} presente en p34Pae23, es una versión más completa del gen, lo que permitió a su vez, la formación de este promotor mediante la fusión del *bla*_{TEM} y la región corriente arriba de este gen.

Para la estandarización se utilizaron como controles ADN de los aislamientos 34Pae36 para la PCR del Tn4401 y ADN de las cepas 33Kpn12 y 34Pae23 para la PCR de los NTE_{KPC}-II, ya que se conocía el tipo de elemento genético asociado a *bla*_{KPC} en estas bacterias (NTE_{KPC}-IIe y NTE_{KPC}-IIf respectivamente). Para las variantes NTE_{KPC}-III, a pesar de ser incluidas para el diseño de las PCRs, no se contó con controles positivos, puesto que no se han reportado en Colombia y no fue posible contactar a los investigadores responsables de estos reportes en otras regiones.

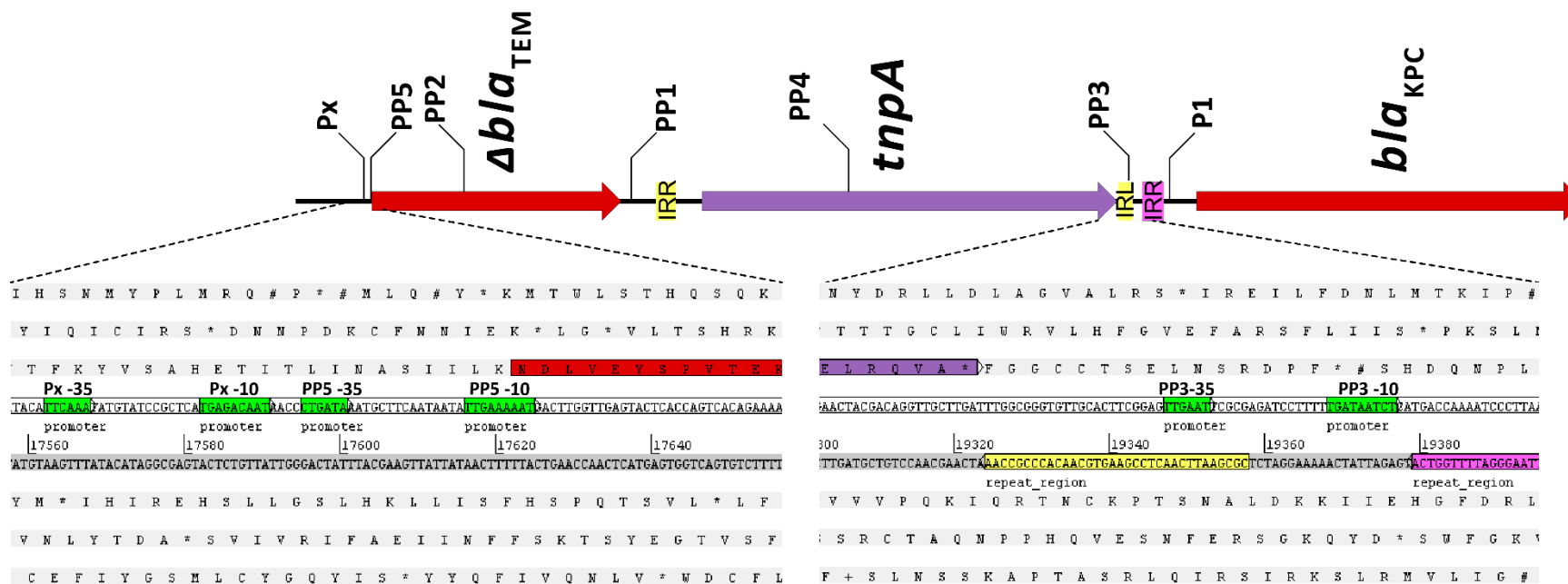
Figura 13).

Para la estandarización se utilizaron como controles ADN de los aislamientos 34Pae36 para la PCR del Tn4401 y ADN de las cepas 33Kpn12 y 34Pae23 para la PCR de los NTE_{KPC}-II, ya que se conocía el tipo de elemento genético asociado a *bla*_{KPC} en estas bacterias (NTE_{KPC}-IIe y NTE_{KPC}-IIf

respectivamente). Para las variantes NTE_{KPC}-III, a pesar de ser incluidas para el diseño de las PCRs, no se contó con controles positivos, puesto que no se han reportado en Colombia y no fue posible contactar a los investigadores responsables de estos reportes en otras regiones.

Los promotores que se encuentran más próximos a *bla*_{KPC} (<1000pb corriente arriba de *bla*_{KPC}), son P1, PP3 y PP4, lo que sugiere que estas 3 regiones promotoras posiblemente jueguen un papel más importante en la expresión de esta carbapenemasas para este elemento. Sin embargo, se requiere de estudios adicionales para validar su papel en la expresión de este gen.

Figura 8. Regiones corrientes arriba de *bla*_{TEM} y *bla*_{KPC}; en donde se ubican los promotores Px, PP5 y PP3. Se muestra una ampliación de los promotores PP5 y PP3 identificados en este estudio. La región promotora PP3 se generó por la fusión del IRL de la *ISPa135* (en amarillo) con el IRR del Tn2 (en rosado). La región promotora PP5 se generó por la fusión de una porción del Δ *bla*_{TEM} (en rojo) con el esqueleto del Tn2-like. Los genes y sus orientaciones de codificación se indican mediante flechas horizontales. Todos los promotores encontrados en la secuencia son mostrados por indicadores junto con su respectivo código (Px, PP5, PP2, PP1, PP4, PP3 y P1). En el acercamiento, las regiones -10 y -35 de los promotores se encuentran delimitadas en recuadros de color verde con su respectivo código encima del recuadro.



7.2 Análisis de la frecuencia de EGM en los aislamientos

Después de caracterizar y clasificar el elemento NTE_{KPC}-IIf presente en el plásmido p34Pae23 de *P. aeruginosa*, se intentó establecer la frecuencia de circulación de estas estructuras NTE_{KPC} en una cohorte de aislamientos clínicos de esta misma especie de circulación en Bogotá y Chía. Para tal fin, fue necesario estandarizar PCRs específicas que permitieran diferenciar las estructuras NTE_{KPC} y los Tn4401.

7.2.1 Diseño y estandarización de las PCR

7.2.1.1 Estrategia de diseño de cebadores para la PCR específica para el Tn4401

Se diseñaron dos pares de cebadores con el objetivo de identificar al Tn4401 y sus variantes. El primer par (Códigos: GN790 y GN791) de oligonucleótidos fue diseñado para detectar los genes *bla*_{KPC} e *istB*, este último junto a *istA* conforman la IS*Kpn7* (Figura 3 y Figura 9). Estos genes fueron seleccionados debido a que hacen parte de una región conservada en las diferentes variantes del Tn4401 y se encuentra ausente en todas las estructuras NTE_{KPC} reportadas hasta la fecha. El tamaño de los amplicones generados en esta PCR depende de la variante del Tn4401, ya que algunas de las isoformas de este transposón sufren una delección en esta región y mayoritariamente son diferenciables por el número de bases delecionadas

(

Figura 6 y Tabla 3).

El segundo par de oligonucleótidos (códigos: GN795 y GN796) fue diseñado para que su región objetivo se encuentre entre los genes *tnpR* y *tnpA* corriente arriba de la *ISK_{pn7}* (Figura 9). La amplificación de esta región permite identificar algunas diferencias adicionales entre las isoformas (Tabla 3 y Figura 9), de modo que, al usar los 2 pares de cebadores en conjunto se pueda distinguir las diferentes variantes del *Tn4401*. Esta distinción es relevante debido a que algunas variantes como el *Tn4401a* o *Tn4401b* tienen una incidencia mayor según lo reportado en la bibliografía (Cheruvanky et al., 2017).

En el caso de los cebadores GN790 y GN791 (Figura 9), la región amplificada es variable por lo que el tamaño del amplicón puede tener desde 268pb (en el caso de las variantes “e” e “i”) hasta 523pb (en el caso de las variantes “b” y “f”). Por el contrario, para los cebadores GN795y GN796 el tamaño del amplicón corresponde a 909 pb, aunque dependiendo de la isoforma, la región puede estar ausente (variantes “e” y “f”), por lo que la información debe ser contrastada con la provista por el amplicón generado por los cebadores GN790 y GN791, para determinar de qué isoforma se trata (ver Tabla 5).

Figura 9. Representación de la ubicación de los oligonucleótidos de la PCR específica para el *Tn4401* y sus variantes. Los genes y sus orientaciones de codificación se indican mediante flechas horizontales, estos se encuentran encerrados en un recuadro de color morado que indica los límites de *Tn4401*. Las flechas blancas representan los cebadores y el producto generado por estos se denota con una línea punteada. Los productos generados por los cebadores GN790 y GN791 amplifican

de forma diferencial para todas las variantes exceptuando la “e” e “i”, que generan productos del mismo tamaño y la “d” que no amplifica. Los amplicones generados por GN795 y GN796 no amplifican para las variantes “e” y “f”.

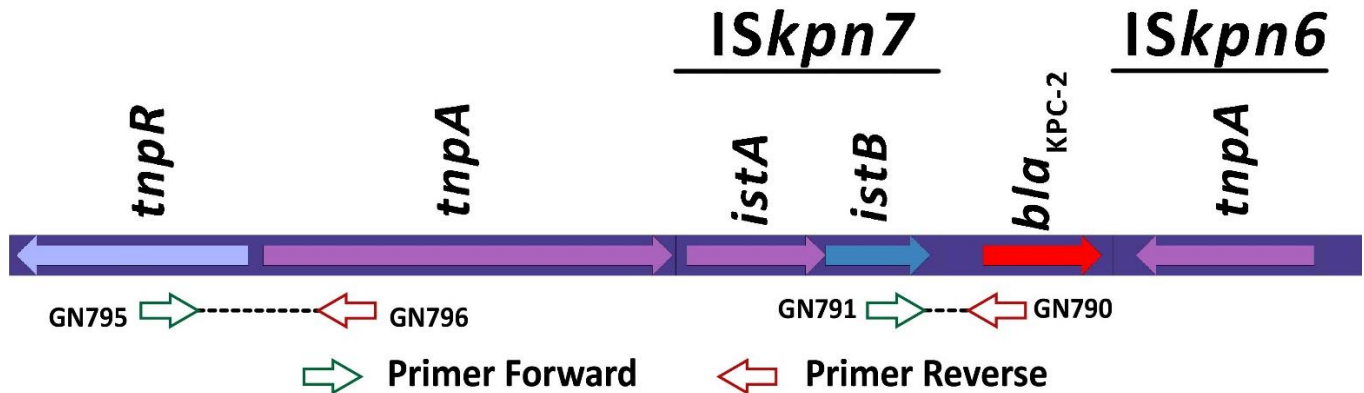


Tabla 3. Productos de PCR para las parejas de oligonucleótidos GN790-GN791 y GN795-GN796. Se muestra el tamaño de la delección en la región *istB-bla_{KPC}* del Tn4401.

| Variante | Producto <i>istB-bla_{KPC}</i> * | Producto <i>tnpR-tnpA</i> * | Región <i>istB-bla_{KPC}</i> ± |
|----------|--|-----------------------------|---|
| | GN790-GN791 | GN795-GN796 | |
| Tn4401a | 424 | 909 | 99 pb |
| Tn4401b | 523 | 909 | 0 pb |
| Tn4401c | 307 | 909 | 216 pb |
| Tn4401d | NA | 909 | Δ <i>bla_{KPC}</i> e <i>ISkpn7</i> ausente |
| Tn4401e | 268 | NA | 255 pb |
| Tn4401f | 523 | NA | 0 pb |
| Tn4401h | 335 | 909 | 188 pb |
| Tn4401i | 268 | 909 | 255 pb |

* NA = no amplifica

± El número indica el tamaño de la delección entre el gen *istB* y *bla_{KPC}*. Las variantes b y f no presentan delección.

La variante reportada como Tn4401g parece corresponder a un NTE_{KPC}-II, ya que esta variante presenta un *bla_{TEM}* corriente arriba del gen *bla_{KPC}*; un criterio que corresponde a las NTE_{KPC} de este tipo (motivo por el cual no se incluyó en los alineamientos de la

Figura 6). Adicionalmente, esta secuencia no posee otras similitudes con las otras variantes del Tn4401 (Anexo 3), por lo que no fue considerada al momento de generar los cebadores.

Los aislamientos que dieron un resultado negativo para esta PCR fueron analizados posteriormente, ya que al no presentar secuencias del Tn4401 o sus variantes, siendo positivos para *bla*_{KPC}, fueron considerados como posibles portadores de estructuras tipo NTE_{KPC}.

7.2.1.2 Estrategia de diseño de Cebadores enfocados a elementos NTE_{KPC}

Este grupo de cebadores tiene como objetivo, identificar los diferentes grupos de NTE_{KPC} reportados previamente en la base de datos del NCBI en este trabajo de grado (ver Tabla 1). La región objetivo está ubicada corriente arriba del *bla*_{KPC} permitiendo la diferenciación por tipos mediante la ejecución de una PCR convencional.

El cebador anti-sentido para todos los amplicones corresponde al GN790, de modo que se ubica sobre el gen *bla*_{KPC} al igual que en la PCR específica para en Tn4401. El oligonucleótido “sentido”, varía dependiendo del tipo de NTE_{KPC}, por lo que los cebadores GN792, GN793 y GN794, en combinación con GN790 generan productos específicos para los elementos NTE_{KPC}-III, NTE_{KPC}-II y NTE_{KPC}-I, respectivamente (Tabla 6 y Figura 10). De modo que cada uno de estos cebadores se alinea con una región distintiva de cada uno de los tipos de NTE_{KPC}. Para la amplificación del NTE_{KPC}-III, el cebador (GN792) se diseñó para alinearse en la *tnpR* presente en el Tn5563 exclusivo de este elemento. Para la amplificación diferencial de los NTE_{KPC}-II, el cebador (GN793) se alinea con el gen de resistencia a antibióticos *bla*_{TEM} y para los NTE_{KPC}-I el cebador diseñado (GN794) se ubica en la *tnpA* de la ISKpn27 (Figura 10 y Tabla 4).

El gen *tnpA* de la *ISKpn27* se encuentra tanto en los NTE_{KPC}-I y II (Figura 10), por lo que la amplificación con la pareja de oligonucleótidos GN790-GN794 genera un producto en ambos grupos. Sin embargo, el tamaño del amplicón y la presencia de *bla*_{TEM} permite diferenciar entre ambos tipos de NTE_{KPC}. En la Tabla 4 y la Figura 10 se ilustra el tamaño de los amplicones para esta PCR.

Tabla 4. Tamaño de los amplicones generados en los diferentes NTE_{KPC}, por las PCR específicas para su identificación.

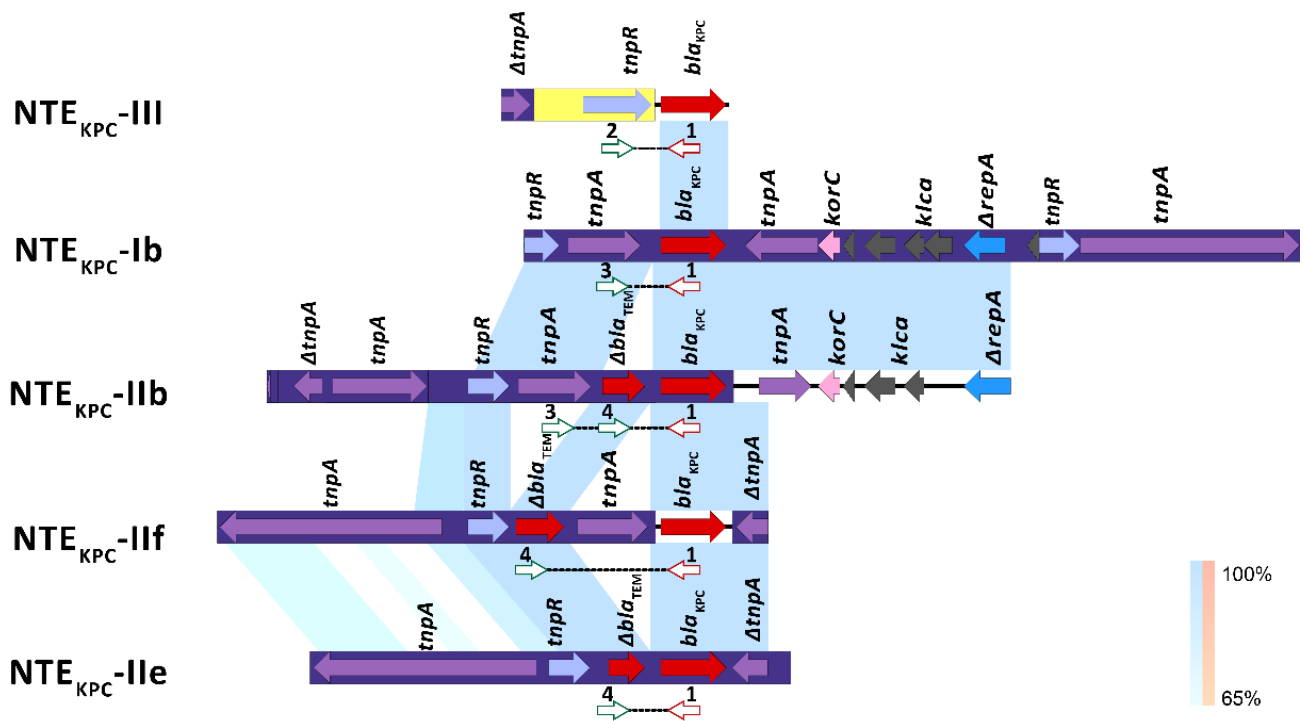
| Variante | Producto | | |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| | GN790-GN792 | GN790-GN793 | GN790-GN794 |
| NTEKPC-Ia | NA | NA | 545 pb |
| NTEKPC-Ib | NA | NA | 545 pb |
| NTEKPC-Ic | NA | NA | 545 pb |
| NTEKPC-IIa | NA | 371 pb | 2286 pb |
| NTEKPC-IIb | NA | 371 pb | 2286 pb |
| NTEKPC-IIc | NA | 371 pb | NA |
| NTEKPC-IId | NA | NA | NA |
| NTEKPC-IIe | NA | 371 pb | NA |
| NTEKPC-IIf | NA | 1461 pb | NA |
| NTEKPC-III | 828 pb | NA | NA |

Adicionalmente, al realizar la PCR específica para los NTE_{KPC} de tipo II (oligonucleótidos GN790/GN793), los subtipos IIa, IIb, IIc y IIe generarán un amplicón de 371 pb (Figura 12). La variante NTE_{KPC}-IIf, por la presencia de la *ISPae135* entre el *bla*_{KPC} y el *bla*_{TEM}, generará un tamaño del amplicón de 1461pb (Figura 10; Tabla 4).

Existen algunas excepciones en cuanto al uso de estas PCR, ya que para aislamientos que posean el NTE_{KPC}-IId, los cebadores no podrán generar un amplicón dado que la región del *bla*_{TEM} que este posee no es compartida con el resto de las variantes de este grupo (Figura 7). Sin embargo, no existe ningún

reporte de este NTE_{KPC} fuera de su país de origen (Brasil) (Ramos et al., 2014). Asimismo, el NTE_{KPC}-Ic tampoco es identificable mediante el uso de los cebadores diseñados, esto se debe a que la *tnpA* se encuentra ausente en este elemento (Figura 7).

Figura 10. Representación esquemática de la ubicación del cebador GN790 en conjunto con GN792, GN793 y GN794 para la amplificación diferencial de NTE_{KPC}-III, NTE_{KPC}-II y NTE_{KPC}-I, respectivamente. Los genes y sus orientaciones de codificación se indican mediante flechas horizontales, estos se encuentran encerrados en recuadros de colores que indican los límites de los diferentes Tn e IS que conforman. Las barras de secuencia azul indican áreas de identidad (o regiones compartidas de homología). Las flechas blancas con contornos de colores representan los cebadores; estos se encuentran por debajo de la secuencia a la que son objetivo; la punta de la flecha indica la ubicación aproximada del cebador en su región blanco.



| 1 GN790 | 4 GN793 | Aislamiento | Primers | Tamaño esperado amplicon |
|---------|---------|-------------|----------------|--------------------------|
| 2 GN792 | 3 GN794 | NTEKPC-III | GN790 - GN 792 | 828 pb |
| | | NTEKPC-Ib | GN 790 -GN 794 | 545 pb |
| | | NTEKPC-IIb | GN 790 -GN 794 | 2286 pb |
| | | NTEKPC-IIf | GN 790 -GN 793 | 371pb |
| | | NTEKPC-IIf | GN 790 -GN 793 | 1461 pb |
| | | NTEKPC-IIe | GN 790 -GN 793 | 371db |

Primer Forward
 Primer Reverse

7.2.2 Estandarización de las PCR

Para el óptimo uso de los cebadores; se empleó un gradiente en el termociclador (evaluando las temperaturas 55°C, 57°C, 59°C, 61°C, 63°C, 65°C y 67°C) con el objetivo de establecer la T_H (temperatura de hibridación) de los diferentes cebadores empleados para el desarrollo de este trabajo. Las mejores condiciones encontradas para el desarrollo de la PCR del Tn4401 y NTE_{KPC}-II se exponen en la Figura 11.

Figura 11. Condiciones para las PCR diseñadas en este estudio. A. Condiciones para la PCR del Tn4401 B. Condiciones para las PCR de los NTE_{KPC}.

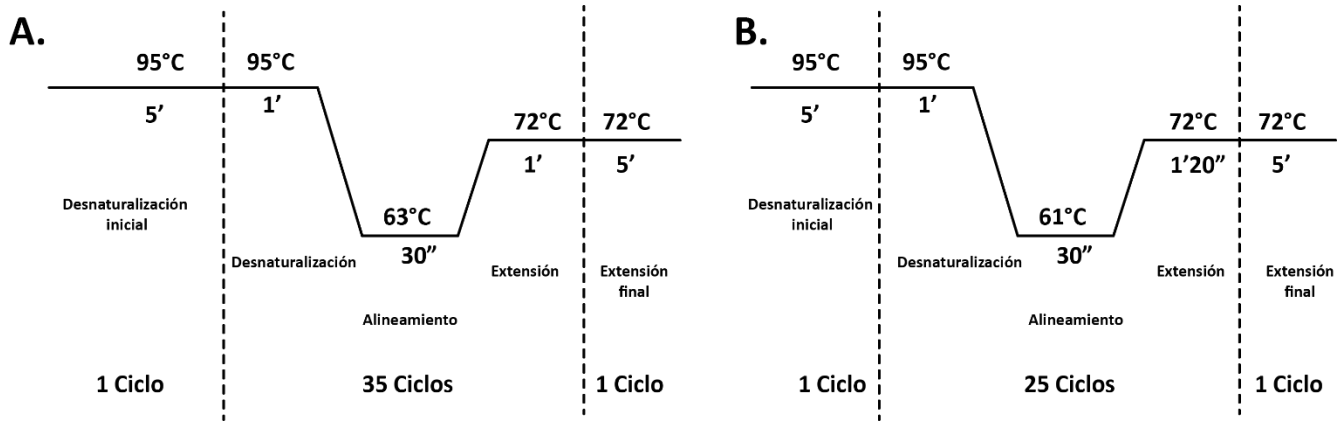
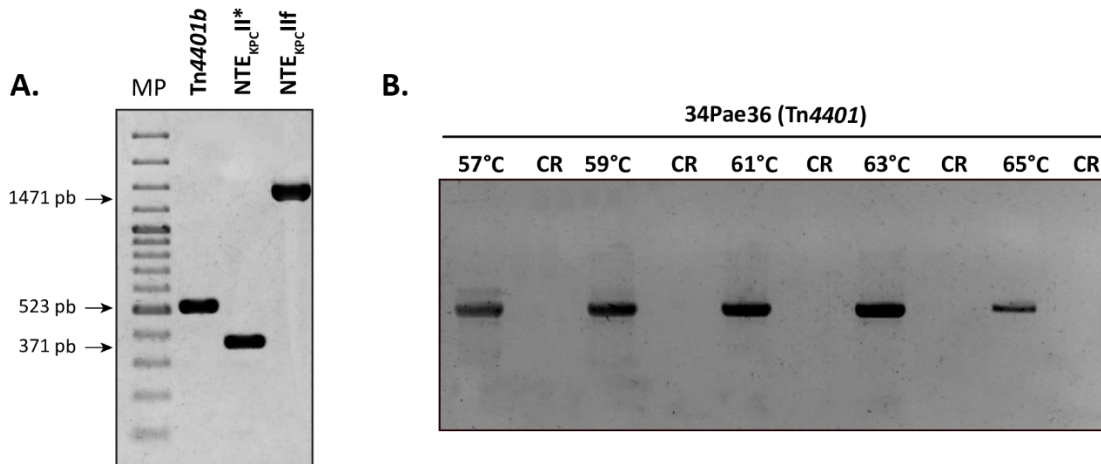
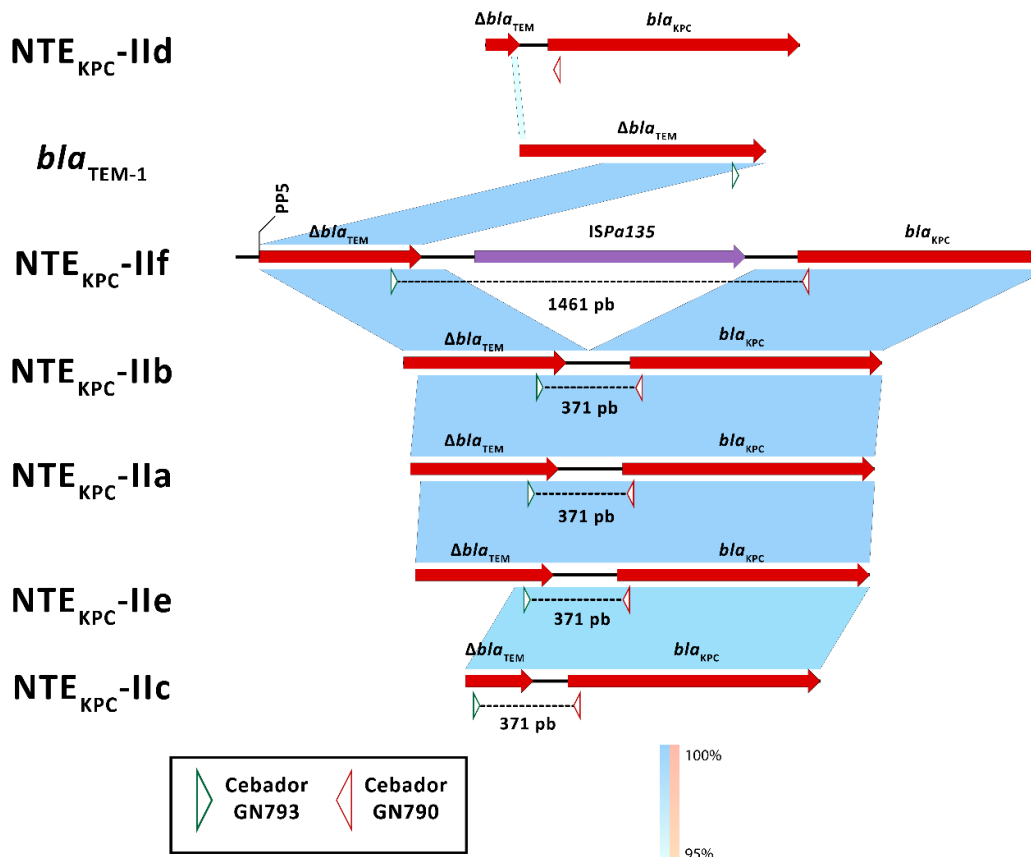


Figura 12. Estandarización de las PCR. A) Productos de PCR visualizados en gel de agarosa por electroforesis para los cebadores GN790 y GN791 (Tn4401b); y GN790 y GN793 (NTE_{KPC}-II^f y NTE_{KPC}-II(a, b, c y e)). B. Gradiente para estandarización de la PCR para el Tn4401. Todos los gels fueron montados junto con su respectivo control negativo (En este caso siendo una ATCC)



Para la estandarización se utilizaron como controles ADN de los aislamientos 34Pae36 para la PCR del Tn4401 y ADN de las cepas 33Kpn12 y 34Pae23 para la PCR de los NTE_{KPC}-II, ya que se conocía el tipo de elemento genético asociado a *bla*_{KPC} en estas bacterias (NTE_{KPC}-IIe y NTE_{KPC}-IIf respectivamente). Para las variantes NTE_{KPC}-III, a pesar de ser incluidas para el diseño de las PCRs, no se contó con controles positivos, puesto que no se han reportado en Colombia y no fue posible contactar a los investigadores responsables de estos reportes en otras regiones.

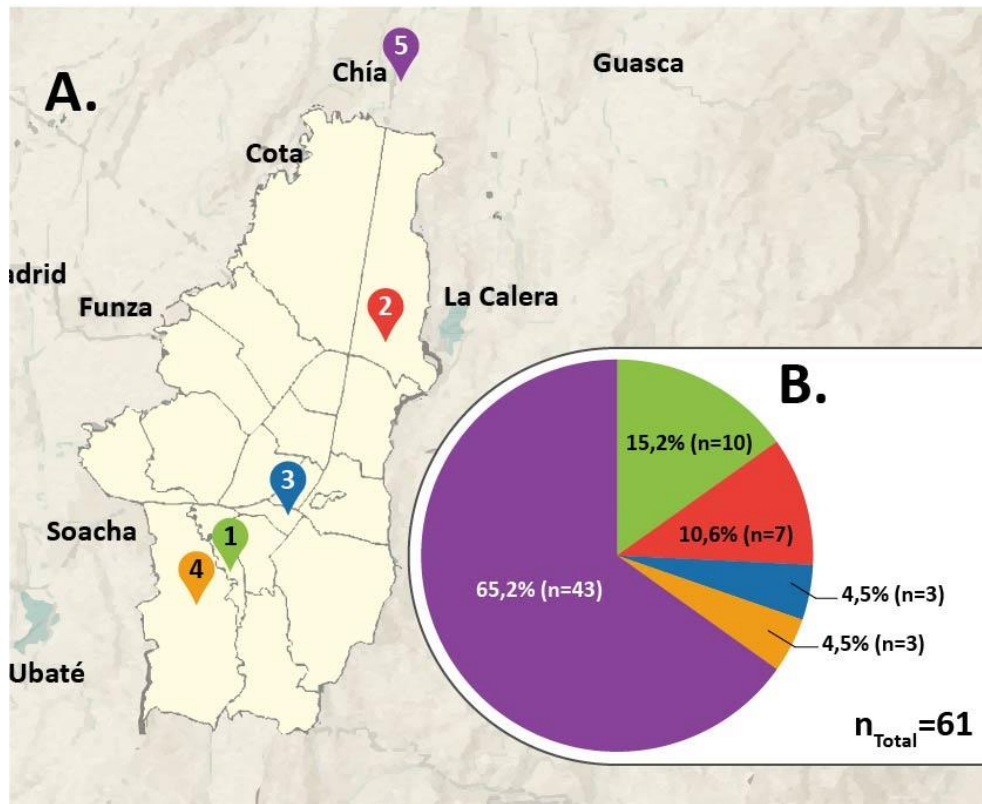
Figura 13. Comparación entre los Δbla_{TEM} que albergan los diferentes NTE_{KPC}-II. *bla*_{TEM} y *bla*_{KPC} y sus orientaciones de codificación son indicadas mediante flechas horizontales rojas.



7.2.3 Análisis de los elementos genéticos asociados al gen bla_{KPC} en una cohorte de aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* de circulación en Bogotá y Chía.

Como se mencionó previamente, este estudio propuso inicialmente el análisis de 23 aislamientos KPC-positivos recolectados en cuatro instituciones de tercer nivel de Bogotá. No obstante, el análisis pudo ampliarse a una institución adicional ubicada en el municipio aledaño de Chía, Cundinamarca (Figura 14).

Figura 14. Distribución de las instituciones y aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* incluidos en este estudio. A) Mapa de Bogotá con la ubicación aproximada de las instituciones de donde fueron obtenidos los aislamientos de *P. aeruginosa* evaluados en este estudio. B) Diagrama de torta que muestra el porcentaje de aislamientos por institución. Los colores del diagrama corresponden a las instituciones mostradas en el mapa.



La institución cinco es la que mayor incidencia de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos presentó. Aunque también se debe tener presente que los aislamientos obtenidos en

esta institución fueron recolectados en un periodo mayor (42 meses en contraste con los 20 meses en los que se recolectaron aislamientos de las otras 4 instituciones). Y que aun así las instituciones uno y dos en conjunto aportaron un porcentaje de 35.76% (n=17) de los aislamientos a este estudio (Figura 14).

7.2.3.1 *Caracterización del entorno genético asociado a bla_{KPC} en los aislamientos clínicos de P. aeruginosa.*

Se ejecutaron las diferentes PCR diseñadas y estandarizadas en este trabajo para la caracterización de la región corriente arriba del gen *bla_{KPC}* en todos los aislamientos, con el fin de identificar y los elementos más prevalentes en esta cohorte de aislamientos, que estén asociados a la diseminación de este gen. Ningún aislamiento amplificó para más de una PCR, lo que sugiere que no presentaban múltiples copias del gen *bla_{KPC}*. En la población analizada se identificaron tres plataformas de movilización asociadas a *bla_{KPC}*; el Tn4401, el NTE_{KPC}-IIf y un NTE_{KPC}-II sin determinar, debido a que los cebadores están diseñados para determinar el grupo de NTE_{KPC} (ya sea I, II o III), mas no la variante específica, ya que el producto generado para los elementos NTE_{KPC}-II; a,b ,c y e es el mismo; 371pb

En términos generales la plataforma asociada a *bla_{KPC}* de mayor prevalencia fue el Tn4401, apareciendo en el 60.7% (n=37) de los aislamientos analizados (Figura 17). Aunque esto se debe principalmente a que este elemento fue predominante en las instituciones cuatro (66.6%, n= 2) y cinco (86.8%, n=33); siendo esta ultima la que mayor número de aislamientos aportó a este estudio (65.2%). En las tres instituciones restantes el NTE_{KPC}-IIf fue el elemento más predominante, con 70% (n=7), 100% (n=7) y 100% (n=3), para las instituciones, uno, dos y tres, respetivamente.

Figura 15. Resultados de las PCR usando oligonucleótidos específicos para el Tn4401 en los aislamientos. A) Amplificación de la región adyacente al gen *bla*_{KPC} usando oligonucleótidos los cebadores correspondientes (GN790 y GN791). Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio. B) Amplificación de la región de la *tnpA* y *tnpR* enfocados a la identificación de las variantes del Tn4401. MP= marcador de peso molecular de 100 pb (para A) y 1 Kb (para B), cada gel fue montado con sus respectivos controles positivos, negativos y de reactivos (sin ADN). Los números corresponden al nombre del aislamiento. En la parte superior se muestra la institución en la que fueron obtenidos. Los resultados se consideraron como positivos si se generó una única banda con los tamaños de amplicón esperados, en caso de presentarse inespecificidades o no presentar ninguna banda el resultado se consideró como negativo. Se debe hacer la aclaración de que todos los geles compilados en esta figura se montaron con sus respectivos controles (Positivo, Negativo y de reactivos). NTE_{KPC-II*} puede corresponder a las variantes; a, b, c y e de estos elementos.

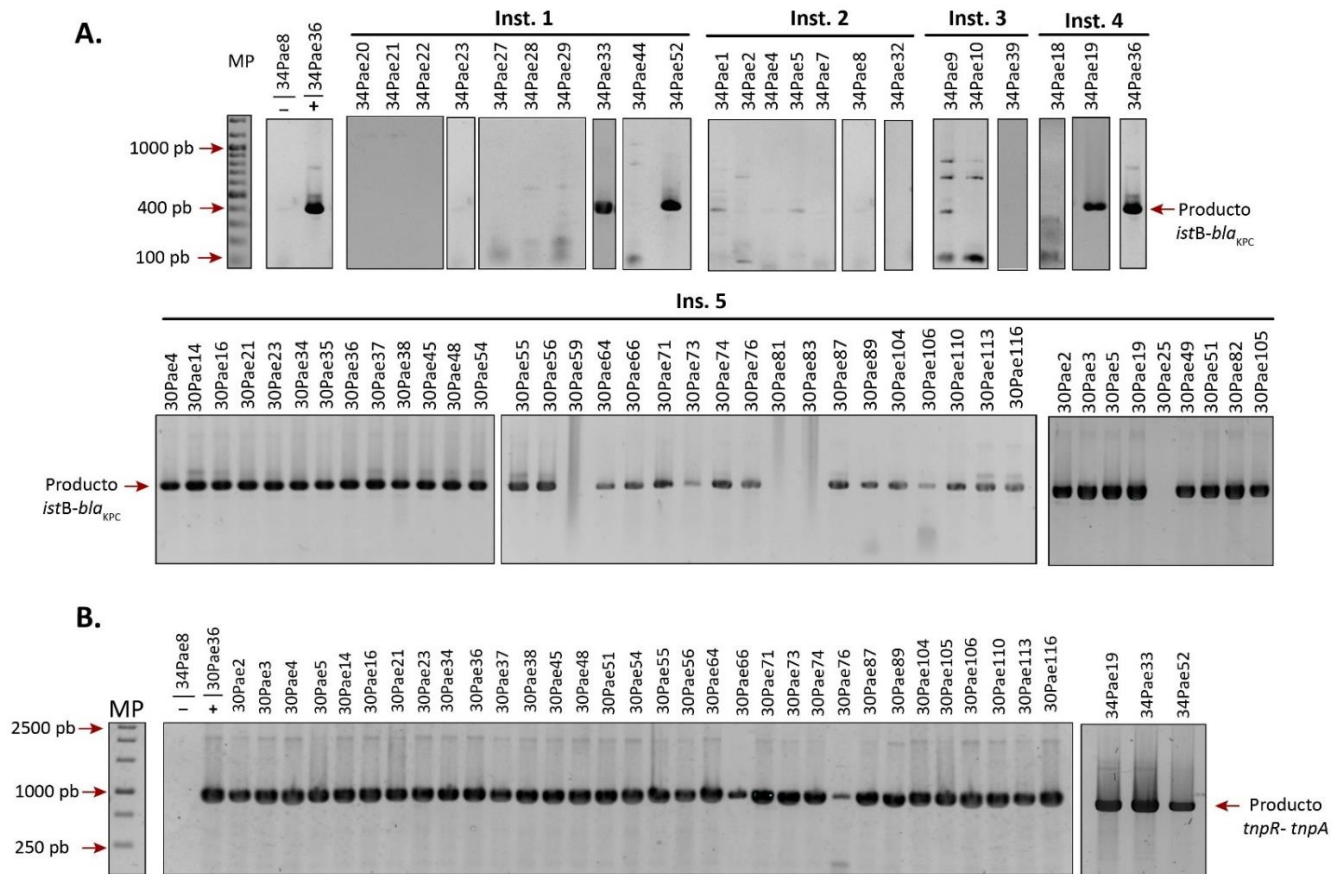
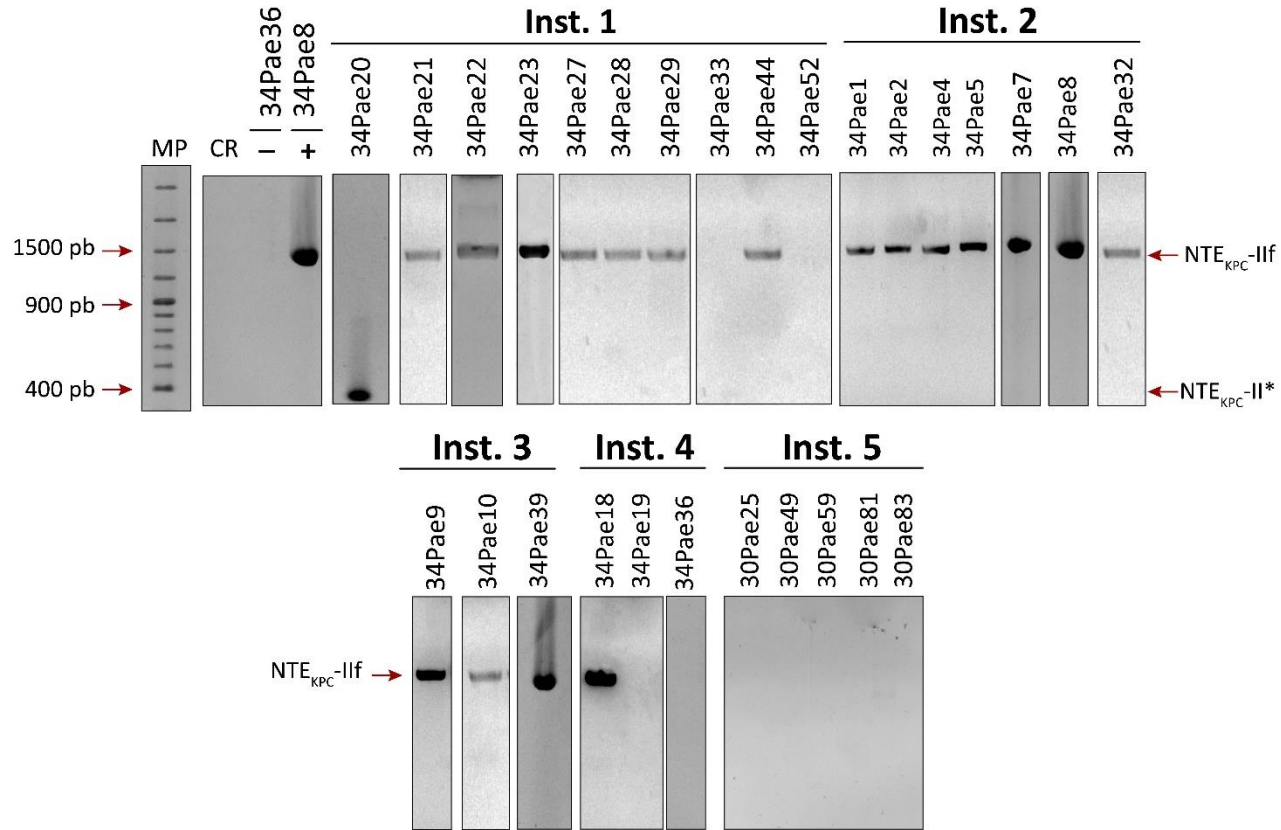
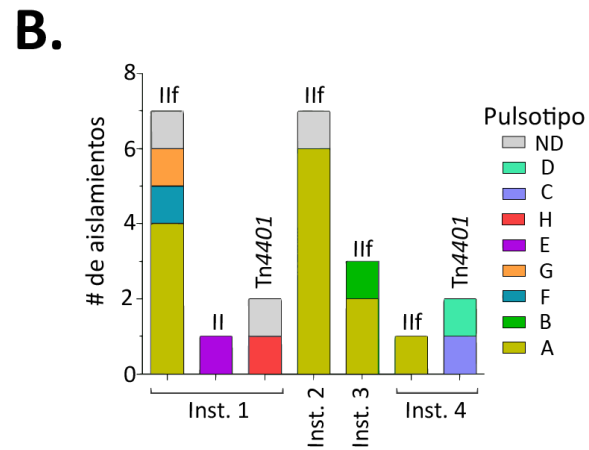
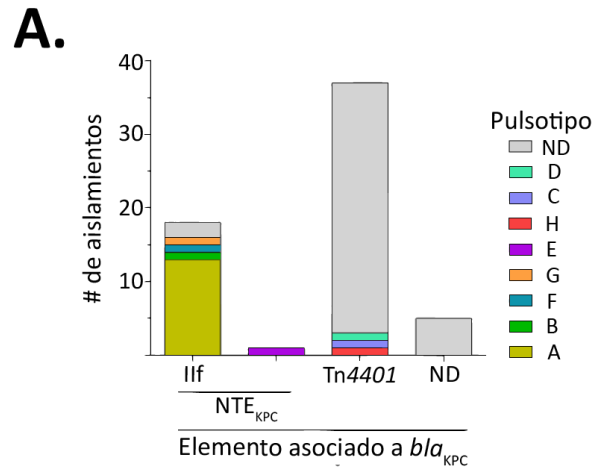


Figura 16. Amplificación por PCR de la región adyacente al gen *bla_{KPC}* usando oligonucleótidos específicos para los elementos NTE_{KPC}. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 1.8% con bromuro de etidio. MP= marcador de peso molecular de 100pb, CR= control de reactivos sin ADN. Los números corresponden al nombre del aislamiento. En la parte superior se muestra la institución en la que fueron obtenidos. Se debe hacer la aclaración de que todos los geles compilados en esta figura se montaron con sus respectivos controles (Positivo, Negativo y de reactivos).



Aunque se encontró predominantemente elementos *Tn4401b* en este grupo de aislamientos, los elementos NTE_{KPC} fueron identificados en un número considerable de muestras analizadas (31.2%, n=19). Estos elementos presentaron mayor frecuencia en las instituciones uno, dos y tres, en donde se encontraron en un 80% (para la institución uno; n=8) y 100% (para las instituciones dos y tres; n=7 y n=3, respectivamente). Este resultado es interesante, puesto que en Colombia se ha reportado el *Tn4401* como el principal elemento asociado a la diseminación de bla_{KPC} (Rada et al., 2020b). Los resultados del presente trabajo muestran que la dinámica de diseminación de este gen de resistencia en *P. aeruginosa* presenta un comportamiento diferente a lo observado en *Klebsiella pneumoniae*.

Figura 17. Frecuencia de los elementos asociado a *bla*_{KPC} en los aislamientos de este estudio. A) información mostrada a nivel general para las cinco instituciones. B) Información distribuida por institución. En ambos diagramas el pulsotipo de los aislamientos (obtenidos previamente por el LGMB), se muestran en diferentes colores. ND= No determinado, ya sea el pulsotipo o el EGM asociado a *bla*_{KPC}



8 Discusión

El incremento en la diseminación de carbapenemasas ha conllevado a un aumento de cepas multirresistentes y la disminución en la efectividad de los antibióticos; siendo KPC la enzima más significativa en aislamientos clínicos. Esto, es un problema a nivel mundial, ya que esta confiere a sus portadores resistencia a penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y carbapenémicos. La diseminación de esta enzima puede ocurrir mediante transferencia horizontal de genes; o la propagación de grupos clonales específicos que se encuentren asociados a este gen (bla_{KPC}). Generalmente este gen de resistencia se encuentra alojado en la estructura del transposón Tn4401; sin embargo, también se encuentra presente en nuevas plataformas asociadas a este gen como los NTE_{KPC}.

Por su parte, *P. aeruginosa* es uno de los causantes de enfermedades nosocomiales más frecuentes, especialmente en individuos inmunocomprometidos y en pacientes ingresados a unidades de cuidado intensivo; siendo las cepas de *Pseudomonas* resistentes a carbapenémicos consideradas como un peligro crítico por la OMS (Shrivastava et al., 2018). Los aislamientos de *P. aeruginosa* analizados en este estudio fueron recolectados de cinco instituciones hospitalarias de la ciudad de Bogotá y el municipio cercano de Chía en Cundinamarca. En total fueron 61 aislamientos, de los cuales, los correspondientes a los códigos 34Pae8 (institución dos), 34Pae23 (institución uno) y 34Pae36 (institución cuatro) fueron secuenciados con tecnología de tercera generación (PacBio) con el fin de obtener un ensamblaje completo (o lo más completo) de sus genomas. Dichos resultados permitieron confirmar para los aislamientos 34Pae8 y

34Pae23 la presencia del plásmido p34Pae23, por lo que ambos presentaron el elemento NTE_{KPC}-IIf caracterizado en este estudio en su estructura, un resultado destacable dado que ambos se encuentran en diferentes instituciones, lo cual demostró que la circulación de este elemento no es exclusiva de una única institución. Adicionalmente, con la secuenciación de genoma completo de estos dos aislamientos, se pudo hacer un análisis del MLST (*Anexo 4*), el cual demostró que ambos aislamientos corresponden al ST235 (*Anexo 4*), un clon disperso a nivel global, y que ha demostrado tener una alta capacidad de adquirir genes de resistencia antibiótica, sugiriendo que la dispersión se dio gracias a este clon, mas no a la movilización de este nuevo elemento NTE_{KPC}. Los aislamientos ST235 previamente descritos con el gen *bla*_{KPC}, han presentado este gen dentro del clásico transposón Tn4401 (Correa et al., 2015; Naas et al., 2008). Sin embargo, hasta donde sabemos es el cuarto reporte de aislamientos de *P. aeruginosa* transportando *bla*_{KPC} embebido en estos nuevos elementos y el primero en el clon de alto riesgo ST235 (Wozniak et al., 2021).

El 34Pae36, por su parte contiene el Tn4401b. Este aislamiento se encontró en la institución 4 y mediante MLST se determinó que corresponde al ST111, otro clon de *Pseudomonas* mundialmente disperso que también representa una amenaza a la salud pública (Vera-Leiva et al., 2017). Sumado a esto, se debe recalcar que este transposón se encontró en el cromosoma del aislamiento; lo cual puede indicar la transmisión vertical del *bla*_{KPC}. En esta institución cuatro, aunque el número de aislamientos analizados fue bajo (n=3), también fue posible encontrar elementos NTE_{KPC}-IIf, aunque en un aislamiento no relacionado (por PFGE) al ST111. Lo cual sugiere una cocirculación de diferentes linajes genéticos con diferentes plataformas transportando *bla*_{KPC} en esta institución.

Por otra parte, en la población total de aislamientos analizados (n=61) se confirmó la presencia de tres plataformas diferentes que portaban al gen *bla*_{KPC}: el Tn4401b (60.7%), y dos variaciones de NTE_{KPC}, la II (1.6%) y IIf (29.5%). En cinco (8.2%) aislamientos (Figura 17), no fue posible caracterizar la región flanqueante al *bla*_{KPC}, puesto que ninguna de las PCRs diseñadas generó algún producto, lo que indica que estos aislamientos no presentan un Tn4401, pero además sugiere la presencia de una nueva variante de NTE_{KPC}. No obstante, se requiere de estudios adicionales para determinar las características de dicha región en estos aislamientos.

El NTE_{KPC}-II fue encontrado en la institución uno en el 34pae20, el cual presentó el pulsotipo E, que a su vez fue exclusivo de este aislamiento. Al realizar la PCR para NTE_{KPC}-II, se encontró que el entorno genético de *bla*_{KPC} en el 34Pae20 se diferenció del NTE_{KPC}-IIf por el tamaño del amplicón generado (aprox 371 pb) (

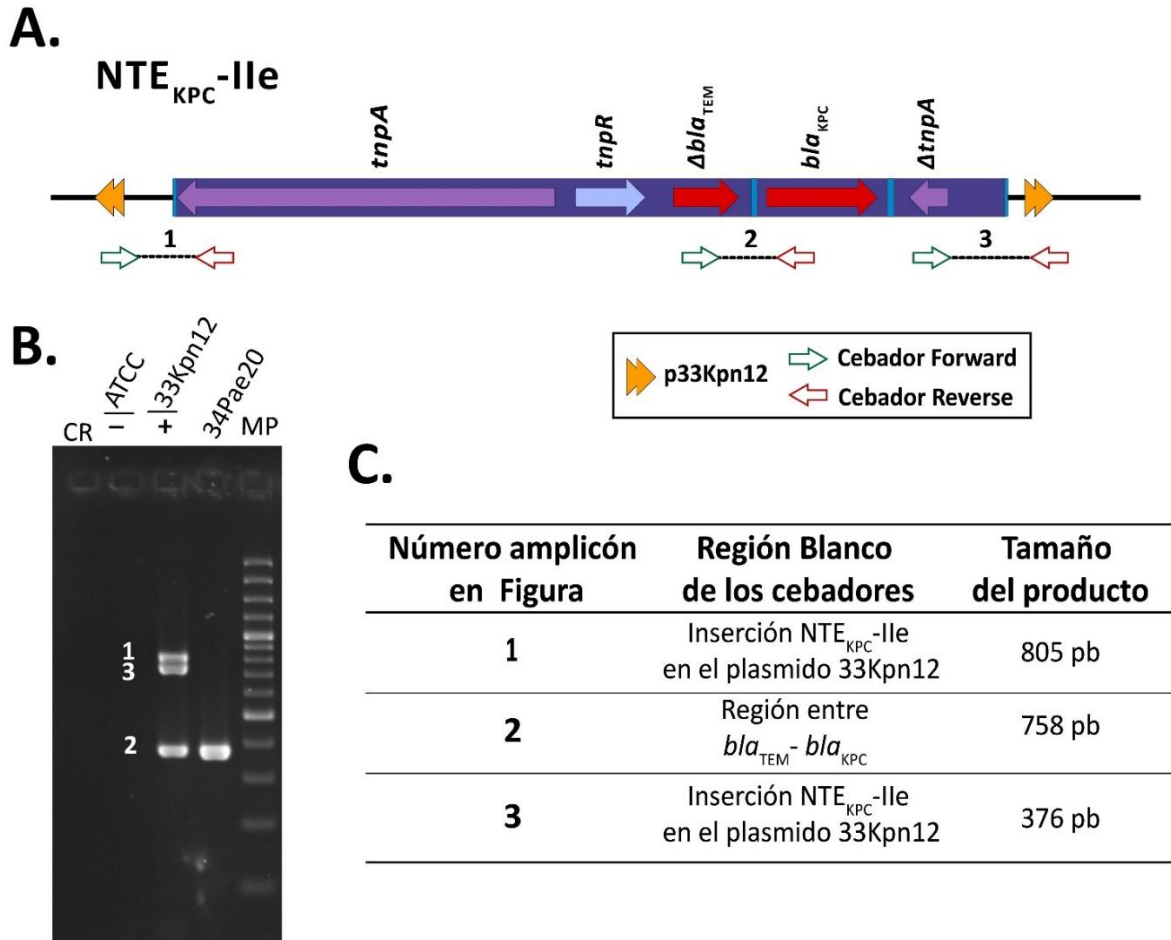
Figura 16), lo que sugiere cuatro posibilidades que podrían explicar el origen de este elemento. En primer lugar, este NTE_{KPC} puede corresponder a una de las variantes $NTE_{KPC-IIc}$ o $NTE_{KPC-IIe}$. Los elementos a y b no fueron tomados en cuenta dado que los resultados de la PCR usando los cebadores GN794 y GN790 dieron resultados negativos, lo cual descarta estas dos variantes.

Una segunda opción, es que la variante de NTE_{KPC-II} encontrada en este aislamiento (34Pae20) corresponda a una versión del $NTE_{KPC-IIf}$ previa a la inserción de la *ISPa135*, de modo que se genere un producto de tamaño similar a las otras variantes del NTE_{KPC-II} .

Aparte de ello, existe una tercera posibilidad que consiste en que la $NTE_{KPC-IIf}$ haya sufrido una delección en la región entre el *bla_{TEM}*. Dicha delección pudo ser producto de un evento de transposición conservativa por parte de la *ISPa135*, es decir, que esta IS se haya movilizado sin dejar una copia de sí misma en el aislamiento. Por último, existe la posibilidad de que se trate de un elemento NTE_{KPC-II} no reportado previamente.

Dado que el LGMB, en un estudio previo encontró el $NTE_{KPC-IIe}$ (Abril et al., 2021). El laboratorio contaba con oligonucleótidos específicos para la detección de esta variante Iie (Figura 18A), los cuales fueron empleados para evaluar mediante PCR la presencia de esta estructura en el aislamiento 34Pae20. No obstante; el resultado de la PCR permitió establecer que este elemento no se encontraba en el aislamiento (Figura 18B). En adición a esto se realizó una PCR con oligonucleótidos específicos para confirmar que el *bla_{TEM}* que presenta este NTE_{KPC} se encontrara completo, sin embargo, el resultado de esta PCR fue negativo, por lo que se asume que al igual que en el resto de NTE_{KPC-II} , este gen se encuentra truncado. No obstante, para confirmar las hipótesis planteadas, se recomienda realizar la secuenciación completa del genoma de este aislamiento.

Figura 18. Ubicación de los cebadores para NTE_{KPC}-IIe A. Esquema explicativo de la ubicación de los cebadores; los genes están representados por flechas de colores, los invertidos repetidos por barras de color azul, el EGM está delimitado por un recuadro morado; y las flechas dobles naranjas representan el plásmido p33Kpn12. B. Gel de agarosa, resultado de utilizar los cebadores del NTE_{KPC}-IIe en el aislamiento 34Pae20. C. Resumen de las regiones blanco de los cebadores.



Uno de los resultados más destacados, fue la presencia del elemento NTE_{KPC}-IIe en aislamientos de diferentes instituciones. Este elemento se presentó en un total de 18 aislamientos (29.5%) distribuidos en cuatro de las cinco instituciones. Adicionalmente, al comparar los resultados con la PFGE, realizada previamente por el LGMB, se encontró que se localiza en al menos 6 pulsotipos (relacionados y no relacionados, ver Figura 17); como el A (incluyendo los subgrupos A1, A2 y A3), F, G e incluso algunos aislamientos con pulsotipos no determinados. Sin mencionar que el pulsotipo más frecuente es el A (y

relacionados). Asimismo, todos los pertenecientes a este pulsotipo presentaron el NTE_{KPC}-IIf (Figura 17), por lo que se puede asociar al clon A (y relacionados) con este elemento; al menos en estas 4 instituciones. De hecho, el 34Pae8, mostró un pulsotipo A1 y curiosamente este aislamiento corresponde al ST235 (verificado usando PubMLST (Jolley et al., 2018)), por lo que se infiere, que la diseminación de este elemento en los aislamientos con pulsotipos A1 y relacionados puede deberse a que este se presentó en un clon de alta diseminación y eventualmente este mutó, dando origen a clones con pulsotipos asociados (A, A2 y A3).

No obstante, el éxito de la diseminación de este elemento en esas cuatro instituciones también pudo darse por conjugación del plásmido p34Pae23. Este escenario es probable, dado que este elemento también se encuentra en pulsotipos no relacionados (A, F y G) (Getino Redondo, 2016). El Análisis en la plataforma OriFinder (Gao & Zhang, 2008) para encontrar orígenes de transferencia putativos (OriT), permitió identificar una secuencia compatible de este tipo (Anexo X), lo que sugiere que esta estructura plasmídica tiene la capacidad de hacer movilización horizontal. Sin embargo, se requiere de análisis más profundos para caracterizar el replicón en donde estas estructuras NTE_{KPC} están siendo transportadas. Una movilización mediante los elementos NTE_{KPC} caracterizados en este estudio es poco probable, puesto que estas estructuras no presentan repetidos invertidos, ni ninguna secuencia que pueda justificar alguna capacidad de movilización como una estructura discreta.

Gracias a un análisis realizado previamente por el LGMB, en el que se realizó una restricción enzimática para diferenciar las variantes alélicas de *bla*_{KPC}, se pudo determinar que en las cuatro primeras instituciones), los aislamientos que presentaron el NTE_{KPC}-IIf contienen el *bla*_{KPC-2} en su estructura en su totalidad. Este resultado apoya la hipótesis de que KPC en estos aislamientos se moviliza por

plásmidos, lo que coincide con lo reportado por Rada et al., 2020a, quienes reportaron que en Colombia *bla_{KPC-2}* se encuentra en plásmidos transferibles lo que conduce a una alta endemicidad de la resistencia.

Para el caso del Tn4401, no se cuenta con resultados de caracterización genómica o de PFGE para la mayoría de estos, dado a que primordialmente corresponden a la institución 5, en donde no se ha determinado aún la relación filogenética de los aislamientos. No obstante, en las 4 primeras instituciones se encontró este transposón en cuatro de los 23 aislamientos, en dos instituciones (uno y dos), con tres pulsotipos no relacionados (C, D y H). Esto puede sugerir la transmisión horizontal del Tn4401 entre los aislamientos de *P. aeruginosa* circulando en estas instituciones. Aunque para verificar esta hipótesis, se debe evaluar la relación filogenética de los aislamientos y determinar las características de los replicones que están transportando este EGM.

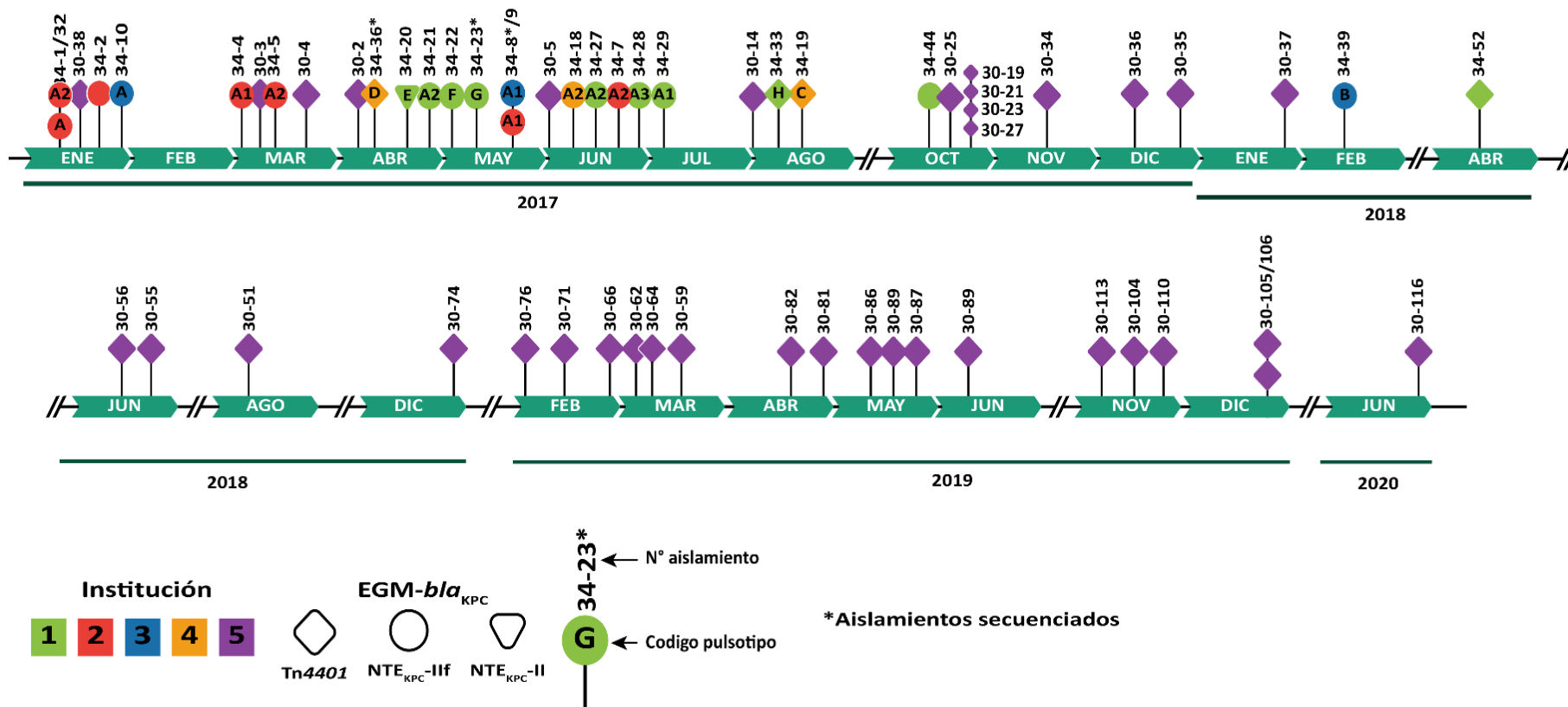
En la institución 5 se encontraron varios aislamientos (5 de 38 aislamientos de esta institución) que no generaron un amplicón con ninguno de los oligonucleótidos diseñados para el Tn4401 o para los elementos NTE_{KPC}. Este resultado sugiere que, aunque en esta institución el Tn4401 es predominante, circulan en baja proporción, otros elementos no caracterizados del tipo NTE_{KPC} transportando *bla_{KPC}*. Sin embargo, no se ha explorado el entorno genético al gen *bla_{KPC}* en estos aislamientos, ya que se considera como una mejor opción la secuenciación completa, ya que en caso de tratarse de un nuevo entorno genético para para este gen, sería muy útil contar con información más completa de su genoma. El *bla_{KPC}* que presentan estos aislamientos es mixto, presentándose tanto en *bla_{KPC-2}* como el *bla_{KPC-3}*.

Asimismo, los resultados tan contrastantes entre la institución cinco y las demás instituciones, puede deberse a la ubicación geográfica de esta institución dado que se encuentra aislada con respecto a las demás (Chía). Por el contrario, las demás instituciones se encuentran más próximas, lo cual puede

facilitar la diseminación entre instituciones. Lo visto en este estudio; es que el elemento NTE_{KPC-II}f está limitado a Bogotá.

Adicionalmente, se debe destacar que *P. aeruginosa* cuenta con un arsenal de genes de resistencia intrínseca a varios grupos de antimicrobianos, lo que hace que estos aislamientos sean una preocupación aún mayor. El 34Pae23 es un claro exponente del peligro que representan estos aislamientos, dentro de las estrategias intrínsecas encontradas (Anexo 2) destacan, los genes *opr* (*outer membrane porin*), que codifican para porinas que restringen el acceso de los antibióticos mediante la alteración de la permeabilidad de la membrana (Li et al., 2012; Troncoso et al., 2017). Genes de bombas de eflujo, cuya función consiste en tomar el antibiótico y expulsarlo de la célula para que de este modo no pueda actuar sobre ella (Tsutsumi et al., 2019). Además mediante mutaciones se puede disminuir la afinidad de unión por el antimicrobiano (Moreno M et al., 2009). E incluso, *P. aeruginosa* posee *ampC*, una betalactamasa producida por *Pseudomonas* que se encuentra codificada en el cromosoma de la bacteria y puede ser inducida por los β -lactámicos, expresándose cuando la bacteria es expuesta a compuestos como la cefalotina y ampicilina (Gómez Álvarez et al., 2005). Estos genes en conjunto le proveen de resistencia ante imipenem, quinolonas, fluoroquinolonas meropenem, penicilinas, cefalosporinas, aminoglucósidos y betalactámicos.

Figura 19. Línea de tiempo general que indica la presencia de uno de los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* KPC positivos evaluados en este estudio en cualquiera de las instituciones. Los meses se muestran en forma de flecha con su respectiva abreviatura, los meses mostrados corresponden desde enero de 2017 hasta junio de 2020. Los aislamientos se indican por medio de señaladores de forma de paleta que se ubican sobre los meses. Sobre el indicador, hay letras en mayúsculas que en algunos casos son acompañadas de números, estos son los diferentes pulsotipos asignados por el LGMB durante la electroforesis de campo pulsado (PFGE). Los números sobre el indicador corresponden al código del aislamiento.



9 Conclusiones

- Se caracterizó el elemento asociado a *bla*_{KPC} en el aislamiento 34Pae23. Por sus características se clasifico como NTE_{KPC}-IIf. Sin embargo, los IRs que delimitan este elemento; no flanquean a *bla*_{KPC}, por lo que no se puede asociar al recién nombrado NTE_{KPC}-IIf con la diseminación de este gen de resistencia.
- Se observo que la frecuencia de los NTE_{KPC} en *Pseudomonas* demostró ser elevado en algunas de las instituciones estudiadas e incluso, ser predominante en algunas de estas. Esto sugiere una dinámica diferente en esta especie, impulsada por estos nuevos elementos que pueden favorecer la diseminación de *bla*_{KPC}. Lo anterior aporta al conocimiento para para el desarrollo de estrategias de contención de la diseminación de la resistencia en esta bacteria.

10 Recomendaciones

Los aislamientos evaluados en este estudio que presentaron el elemento NTE_{KPC}-IIf fueron encontrados en varias instituciones predominando en tres de las cinco instituciones evaluadas. Sin embargo, la diseminación del *bla*_{KPC} no se le puede atribuir a este elemento dado a que no contiene a este gen de resistencia entre sus repetidos invertidos. No obstante, los resultados sugieren que la circulación de estos elementos pudo darse por la propagación del p34Pae23 mediante conjugación. Sin embargo, esto no se corroboró dado a que no corresponde al alcance de este estudio y se sugiere evaluar dicha hipótesis. Dado que este sigue siendo un aporte relevante para el estudio de la diseminación de *bla*_{KPC}.

Se sugiere realizar un análisis mediante MLST en los aislamientos que presenten un mismo pulstipo; para de este modo corroborar los linajes genéticos a los que corresponden estos pulstipos y por los que están circulando los elementos NTE_{KPC} encontrados en este estudio. Adicionalmente ahondar en las características del 34Pae20, dado que se puede tratar de un nuevo elemento NTE_{KPC}; o se puede encontrar un NTE_{KPC} reportado previamente en una nueva área geográfica.

La frecuencia de elementos NTE_{KPC} en *Pseudomonas aeruginosa* no se ha esclarecido todavía, dado a que la nomenclatura establecida por Chen et al en 2014 es muy reciente y los estudios tienden a centrarse en los reportes de la plataforma más frecuente (Tn4401). Esto sumado a la aparición de nuevos entornos genéticos asociados al gen *bla*_{KPC} en *Pseudomonas*, sugiere que este tipo de elementos son más frecuentes de lo que se cree actualmente, por lo que se sugiere realizar una revisión de los reportes generados hasta la fecha.

11 Limitaciones

En cuanto a la técnica empleada, no se encontraron reportes de PCRs que permitieran detectar todas las variantes del *Tn4401* y los diferentes grupos de NTE_{KPC} . Sin embargo, al implementar esta técnica se debe tener presente que el *Tn4401g* no fue considerada como una isoforma, dado a que presentaba una estructura más similar a los NTE_{KPC-II} .

Los $NTE_{KPC-IIId}$ y NTE_{KPC-Ic} no pueden ser detectadas mediante esta técnica. Debido a que el *bla_{TEM}* del $NTE_{KPC-IIId}$ está incompleto y no presenta la región donde se alinea el cebador GN793 y en el NTE_{KPC-Ic} la *ISKpn8* se encuentra ausente, por lo que en ninguno de los casos se puede generar un producto.

Adicionalmente, los análisis bioinformáticos deben ser corroborados mediante experimentación.

12 Bibliografía

- Abril, D., Vergara, E., Leal, A. L., Madroñero, J., Lorena, Z., Rozo, C., De, Z., Rosa, L., Nieto, C. A., Vanegas, N., Cortés, J. A., & Escobar-Perez, J. (2021). *Within-patient Genetic Diversity of blaKPC Harboring K. pneumoniae Isolates in a Colombian High Complexity Hospital. Identification of a New Tn3-based NTEKPC-IIe Mobilization Platform*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-629847/v1>
- Altschup, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, 215, 403–410.
- Arango Alvarado, J. J. (2014). *Perfil epidemiológico, clínico, fenotípico y genético de Pseudomonas aeruginosa en La Fundación Hospital de la Misericordia durante los años 2013-2014*. 57. <http://www.bdigital.unal.edu.co/47065/>
- Barría-Loaiza, C., Pincheira, A., Quezada, M., Vera, A., Valenzuela, P., Domínguez, M., Lima, C. A., Araya, I., Araya, P., Prat, S., Aguayo, C., Fernández, J., Carlos, J., Bal, H., Bello-Toledo, H., & González-Rocha, G. (2016). *Molecular typing and genetic environment of the bla KPC gene in Chilean isolates of Klebsiella pneumoniae*. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.01.001>
- Bennett, P. M. (2004). Genome plasticity. *Genomics, Proteomics, and Clinical Bacteriology*, 71–113.
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA345>
- Caparrós Rodríguez, M. (1992). *Incorporación postinsercional de D-aminoácidos en la mureína de Escherichia coli*. <https://repositorio.uam.es/handle/10486/664804>
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L., & Threlfall, E. J. (2005). *Identification of plasmids by PCR-based replicon typing*. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018>
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M.-A., Barrell, B. G., & Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics*, 21(16), 3422–3423. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTI553>
- Cerdeira, L. T., Lam, M. M. C., Wyres, K. L., Wick, R. R., Judd, L. M., Lopes, R., Ribas, R. M., Morais, M. M., Holt, K. E., & Lincopan, N. (2019). Small IncQ1 and col-like plasmids harboring blaKPC-2 and non-Tn4401 elements (NTEKPC-IIe) in high-risk lineages of Klebsiella pneumoniae CG258. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(3), 1–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.02140-18>
- Chen, L., Chavda, K. D., Al Laham, N., Melano, R. G., Jacobs, M. R., Bonomo, R. A., & Kreiswirth, B. N. (2013). Complete nucleotide sequence of a blaKPC-harboring Inc12 plasmid and its dissemination in New Jersey and New York Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,

57(10), 5019–5025. <https://doi.org/10.1128/AAC.01397-13>

- Chen, L., Chavda, K. D., Melano, R. G., Hong, T., Rojzman, A. D., Jacobs, M. R., Bonomo, R. A., & Kreiswirth, B. N. (2014). Molecular survey of the dissemination of two blaKPC-harboring IncFIA plasmids in New Jersey and New York Hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), 2289–2294. <https://doi.org/10.1128/AAC.02749-13>
- Chen, L. F., Anderson, D. J., & Paterson, D. L. (2012). Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infection and Drug Resistance*, 5(1), 133. <https://doi.org/10.2147/IDR.S26613>
- Chen, L., Mathema, B., Chavda, K. D., DeLeo, F. R., Bonomo, R. A., & Kreiswirth, B. N. (2014). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Molecular and genetic decoding. In *Trends in Microbiology* (Vol. 22, Issue 12, pp. 686–696). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.003>
- Chen, Y.-T., Lin, J.-C., Fung, C.-P., Lu, P.-L., Chuang, Y.-C., Wu, T.-L., & Siu, L. K. (2014). KPC-2-encoding plasmids from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3), 628–631. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKT409>
- Cheruvanky, A., Stoesser, N., Sheppard, A. E., Crook, D. W., Hoffman, P. S., Weddle, E., Carroll, J., Sifri, C. D., Chai, W., Barry, K., Ramakrishnan, G., & Mathers, A. J. (2017). Enhanced *klebsiella pneumoniae* carbapenemase expression from a novel Tn4401 deletion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(6). https://doi.org/10.1128/AAC.00025-17/SUPPL_FILE/ZAC006176226S1.PDF
- Córdova, E., Lespada, M. I., Gómez, N., Pasterán, F., Oviedo, V., & Rodríguez-Ismael, C. (2012). Descripción clínica y epidemiológica de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en Buenos Aires, Argentina. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(7), 376–379. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.12.003>
- Correa, A., Campo, R. del, Perenguez, M., Blanco, V. M., Rodríguez-Baños, M., Perez, F., Maya, J. J., Rojas, L., Cantón, R., Arias, C. A., & Villegas, M. V. (2015). Dissemination of High-Risk Clones of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(4), 2421. <https://doi.org/10.1128/AAC.03926-14>
- Cuesta, D., Vallejo, M., Guerra, K., Cárdenas, J., Hoyos, C., Loaiza, E., & Virginia Villegas, M. (2012). Infección intrahospitalaria por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: estudio de casos y controles Nosocomial infection by multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: case-control study Infecção intrahospitalária por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: estudo de casos e controles. In *Medicina UPB* (Vol. 31, Issue 2). <https://revistas.upb.edu.co/index.php/medicina/article/view/1673>
- Cuzon, G., Naas, T., & Nordmann, P. (2011). Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in bla KPC gene mobilization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5370–5373. <https://doi.org/10.1128/AAC.05202-11>
- De Jonge, B. L. M., Wientjes, F. B., Jurida, I., Driehuis, F., Wouters, J. T. M., & Nanninga, N. (1989).

Peptidoglycan synthesis during the cell cycle of *Escherichia coli*: Composition and mode of insertion. *Journal of Bacteriology*, 171(11), 5783–5794. <https://doi.org/10.1128/jb.171.11.5783-5794.1989>

de Lima, G. J., Scavuzzi, A. M. L., Beltrão, E. M. B., Firmo, E. F., de Oliveira, É. M., de Oliveira, S. R., Rezende, A. M., & Lopes, A. C. de S. (2020). Identification of plasmid incQ1 and NTEKPC-iiid harboring blaKPC-2 in isolates from *Klebsiella pneumoniae* infections in patients from Recife-PE, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, 1–5. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0526-2019>

El-Gamal, M. I., Brahim, I., Hisham, N., Aladdin, R., Mohammed, H., & Bahaaeldin, A. (2017). Recent updates of carbapenem antibiotics. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 131, pp. 185–195). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.022>

Gao, F., & Zhang, C. T. (2008). Ori-Finder: A web-based system for finding oriCs in unannotated bacterial genomes. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-79/FIGURES/2>

Getino Redondo, M. (2016). *Control de la conjugación bacteriana*. <http://hdl.handle.net/10902/8477>

Gómez Álvarez, C. A., Leal Castro, A. L., Pérez de Gonzalez, M. de J., & Navarrete Jiménez, M. L. (2005). *MECANISMOS DE RESISTENCIA EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA: ENTENDIENDO A UN PELIGROSO ENEMIGO*. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-00112005000100004

Gupta, S. K., Padmanabhan, B. R., Diene, S. M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., & Rolain, J. M. (2014). ARG-annot, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 212–220. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>

Huang, J., Hu, X., Zhao, Y., Shi, Y., Ding, H., Wu, R., Zhao, Z., & Ji, J. (2019). Comparative analysis of blaKPC expression in Tn4401 transposons and the Tn3-Tn4401 chimera. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(5). <https://doi.org/10.1128/AAC.02434-18>

Hunt, M., Mather, A. E., Sánchez-Busó, L., Page, A. J., Parkhill, J., Keane, J. A., & Harris, S. R. (2017). ARIBA: Rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microbial Genomics*, 3(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000131>

INS. (2019). Informe De Resultados De La Vigilancia Por Laboratorio De Resistencia Antimicrobiana En Infecciones Asociadas a La Atención En Salud (Iaas) 2018 Dirección. *Epidemiología de Las Infecciones Asociadas a La Atención En Salud*, 29–44.

Jia, B., Raphenya, A. R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K. K., Lago, B. A., Dave, B. M., Pereira, S., Sharma, A. N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L. E., Frye, J. G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E. L., Pawlowski, A. C., ... McArthur, A. G. (2017). CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D566–D573. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW1004>

Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics:

BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*, 3. <https://doi.org/10.12688/WELLCOMEOPENRES.14826.1>

- Lakin, S. M., Dean, C., Noyes, N. R., Dettenwanger, A., Ross, A. S., Doster, E., Rovira, P., Abdo, Z., Jones, K. L., Ruiz, J., Belk, K. E., Morley, P. S., & Boucher, C. (2017). MEGARes: an antimicrobial resistance database for high throughput sequencing. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D574–D580. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW1009>
- Lee, C.-R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Frontiers in Microbiology*, 0(JUN), 895. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00895>
- Li, H., Luo, Y.-F., Williams, B. J., Blackwell, T. S., & Xie, C.-M. (2012). Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 302(2), 63–68. <https://doi.org/10.1016/J.IJMM.2011.10.001>
- Lopez, J. A., Correa, A., Navon- Venezia, S., Correa, A. L., Torres, J. A., Briceño, D. F., Montealegre, M. C., Quinn, J. P., Carmeli, Y., & Villegas, M. V. (2011). Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC- 3- producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(1), 52–56. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03209.x>
- Maraolo, A. E., Cascella, M., Corcione, S., Cuomo, A., Nappa, S., Borgia, G., De Rosa, F. G., & Gentile, I. (2017). Management of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit: state of the art. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 15(9), 861–871. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1367666>
- Moreno M, C., González E, R., & Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 69(2), 185–192. <https://doi.org/10.4067/S0718-48162009000200014>
- Naas, T., Cuzon, G., Truong, H.-V., & Nordmann, P. (2012). Role of ISKpn7 and Deletions in blaKPC Gene Expression. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(9), 4753. <https://doi.org/10.1128/AAC.00334-12>
- Naas, T., Cuzon, G., Villegas, M. V., Lartigue, M. F., Quinn, J. P., & Nordmann, P. (2008). Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase blaKPC gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1257–1263. <https://doi.org/10.1128/AAC.01451-07>
- Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, 18(5), 263–272. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2012.03.003>
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*, 21–22, 41–59. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2015.08.002>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated

with antimicrobial resistance. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 31, Issue 4). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>

Peleg, A. Y., & Hooper, D. C. (2010). Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *New England Journal of Medicine*, 362(19), 1804–1813. <https://doi.org/10.1056/nejmra0904124>

Rada, A. M., de la Cadena, E., Agudelo, C., Capataz, C., Orozco, N., Pallares, C., Dinh, A. Q., Panesso, D., Ríos, R., Diaz, L., Correa, A., Hanson, B. M., Villegas, M. V., Arias, C. A., & Restrepo, E. (2020a). Dynamics of blaKPC-2 Dissemination from Non-CG258 *Klebsiella pneumoniae* to Other Enterobacteriales via IncN Plasmids in an Area of High Endemicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(12). https://doi.org/10.1128/AAC.01743-20/SUPPL_FILE/AAC.01743-20-SD002.XLSX

Rada, A. M., de la Cadena, E., Agudelo, C., Capataz, C., Orozco, N., Pallares, C., Dinh, A. Q., Panesso, D., Ríos, R., Diaz, L., Correa, A., Hanson, B. M., Villegas, M. V., Arias, C. A., & Restrepo, E. (2020b). E. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(12). https://doi.org/10.1128/AAC.01743-20/SUPPL_FILE/AAC.01743-20-SD002.XLSX

Ramos, P. I. P., Picão, R. C., Almeida, L. G. P. de, Lima, N. C. B., Girardello, R., Vivan, A. C. P., Xavier, D. E., Barcellos, F. G., Pelisson, M., Vespero, E. C., Médigue, C., Vasconcelos, A. T. R. de, Gales, A. C., & Nicolás, M. F. (2014). Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC Genomics*, 15(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-54>

Remolina Granados, S. A., & Escobar Castaño, C. J. (2017). *DESCRIPCIÓN DE TIPOS DE CARBAPENEMASAS EXPRESADAS EN Klebsiella sp. y Pseudomonas aeruginosa EN HOSPITALES DE TERCER NIVEL DE LA CIUDAD DE BOGOTÁ, ESTUDIO DESCRIPTIVO. PARTE 1.*

Rossi, S. (2006). *Australian medicines handbook* (J. DiPiro (ed.)). [https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=X2C1DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA75&dq=Rossi,+S.+\(2006\).+Australian+medicines+handbook+\(pp.+143-145\).+Sydney.&ots=MAFF98A0m8&sig=V8vM0pGh6WdMa8vaMfSFkTomCeM&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=X2C1DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA75&dq=Rossi,+S.+(2006).+Australian+medicines+handbook+(pp.+143-145).+Sydney.&ots=MAFF98A0m8&sig=V8vM0pGh6WdMa8vaMfSFkTomCeM&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

Ruiz Martínez, L. (2007). “*Pseudomonas aeruginosa*”: Aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. <https://www.tdx.cat/handle/10803/2521>

Schumann, P. (2011). Peptidoglycan Structure. In *Methods in Microbiology* (Vol. 38, pp. 101–129). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00005-X>

Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>

Selmann, G., & Holst, O. (2002). *The Bacterial Cell Wall* (First edition). <https://books.google.com.co/books?hl=es&lr=&id=j637CAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=bact>

erial+wall&ots=04oAyZc-Dj&sig=RGrgtBEbtZfmB_9icjSP-
y90uTU&redir_esc=y#v=onepage&q=bacterial wall&f=false

- Shrivastava, S. R., Shrivastava, P. S., & Ramasamy, J. (2018). World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *JMS - Journal of Medical Society*, 32(1), 76–77. https://doi.org/10.4103/jms.jms_25_17
- Siguiet, P., Varani, A., Perochon, J., & Chandler, M. (2012). Exploring bacterial insertion sequences with ISfinder: Objectives, uses, and future developments. *Methods in Molecular Biology*, 859, 91–103. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-603-6_5
- Solovyev, V. (2011). Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies* (Ed. R.W. Li). Nova Science Publishers, February, 61–78. https://www.researchgate.net/publication/259450599_V_Solovyev_A_Salamov_2011_Automatic_Annotation_of_Microbial_Genomes_and_Metagenomic_Sequences_In_Metagenomics_and_its_Applications_in_Agriculture_Biomedicine_and_Environmental_Studies_Ed_RW_Li_Nova_Sc
- Souza, R. C. de, Dabul, A. N. G., Boralli, C. M. dos S., Zuvanov, L., & Camargo, I. L. B. da C. (2019). Dissemination of blaKPC-2 in an NTEKPC by an IncX5 plasmid. *Plasmid*, 106, 102446. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2019.102446>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., & Beatson, S. A. (2011). Easyfig: A genome comparison visualizer. *Bioinformatics*, 27(7), 1009–1010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039>
- Tansirichaiya, S., Rahman, M. A., & Roberts, A. P. (2019). The Transposon Registry. *Mobile DNA 2019 10:1*, 10(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S13100-019-0182-3>
- Todar, K. (2015). *Online Textbook of Bacteriology*. <http://textbookofbacteriology.net/>
- Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., Barrientos, L., Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., & Barrientos, L. (2017). Implicancias Estructurales y Fisiológicas de la Célula Bacteriana en los Mecanismos de Resistencia Antibiótica. *International Journal of Morphology*, 35(4), 1214–1223. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022017000401214>
- Tsutsumi, K., Yonehara, R., Ishizaka-Ikeda, E., Miyazaki, N., Maeda, S., Iwasaki, K., Nakagawa, A., & Yamashita, E. (2019). Structures of the wild-type MexAB–OprM tripartite pump reveal its complex formation and drug efflux mechanism. *Nature Communications 2019 10:1*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09463-9>
- Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M., Bello-Toledo, H., & González-Rocha, G. (2017). KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista Chilena de Infectología*, 34(5), 476–484. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>
- Villegas, M. V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J. N., Lopez, J. A., & Quinn, J. P. (2007). First

identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1553–1555. <https://doi.org/10.1128/AAC.01405-06>

- Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 2, pp. 149–167). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Winstanley, C., Langille, M. G. I., Fothergill, J. L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrín, F., Thomson, N. R., Winsor, G. L., Quail, M. A., Lennard, N., Bignell, A., Clarke, L., Seeger, K., Saunders, D., Harris, D., Parkhill, J., Hancock, R. E. W., Brinkman, F. S. L., & Levesque, R. C. (2009). Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the liverpool epidemic strain of *pseudomonas aeruginosa*. *Genome Research*, 19(1), 12–23. <https://doi.org/10.1101/gr.086082.108>
- Wozniak, A., Figueroa, C., Moya-Flores, F., Guggiana, P., Castillo, C., Rivas, L., Munita, J. M., & García, P. C. (2021). A multispecies outbreak of carbapenem-resistant bacteria harboring the blaKPC gene in a non-classical transposon element. *BMC Microbiology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/S12866-021-02169-3>
- Wright, M. H., Adelskov, J., & Greene, A. C. (2017). Bacterial DNA Extraction Using Individual Enzymes and Phenol/Chloroform Separation. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 18(2). <https://doi.org/10.1128/JMBE.V18I2.1348>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012 13:1, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1151–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F. M., & Larsen, M. V. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2640–2644. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKS261>
- Zarza, V. M. P., Mordani, S. M., Maldonado, A. M., Hernández, D. Á., Georgina, S. G. S., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenicity and antimicrobial resistance in urinary tract infection. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180–189. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182019000200180>

13 Anexos

Anexo 1. Genes de resistencia antibiótica encontrados mediante el uso de ResFinder (Bortolaia et al., 2020) en el genoma del aislamiento 34Pae23.

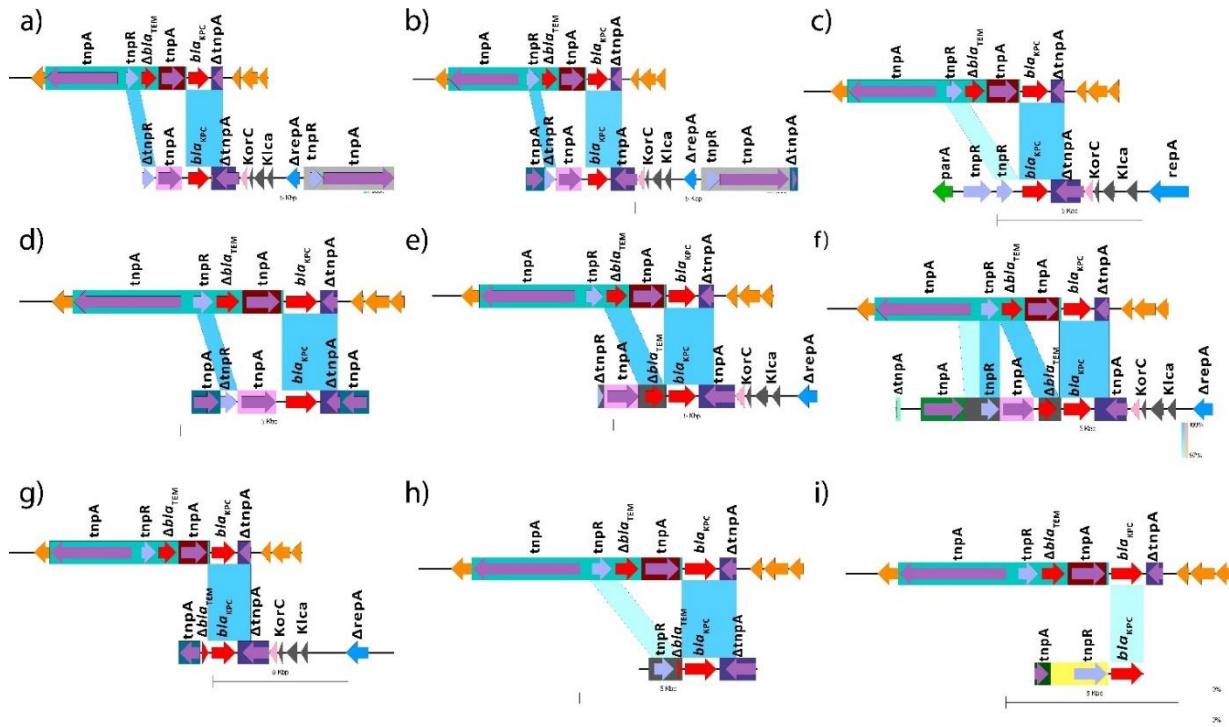
| Antibiótico | Gen de resistencia | Ubicación* | Identidad | Acceso | Posición en genoma |
|-----------------|--------------------------|------------|-----------|--------------|--------------------|
| Fosfomicina | <i>fosA</i> | 34Pae23 | 99.02 | ACWU01000146 | 4591427..4591834 |
| | <i>aph(3')-IIIb</i> | 34Pae23 | 98.76 | CP006832 | 929592..930398 |
| Aminoglicósidos | <i>aac(6')-29b</i> | p34Pae23 | 98.25 | AF263519 | 34949..35347 |
| | <i>aadA6</i> | 34Pae23 | 100 | AF140629 | 2504903..2505748 |
| Quinolonas | <i>crpP</i> | 34Pae23 | 98.48 | HM560971 | 5546050..5546247 |
| Sulfonamidas | <i>sulI</i> | 34Pae23 | 100 | U12338 | 2506526..2507365 |
| Cloranfenicol | <i>catB7</i> | 34Pae23 | 98.75 | AF036933 | 5171975..5172613 |
| Betalactámicos | <i>bla_{PDC}</i> | 34Pae23 | 99.25 | AY083592 | 942754..943947 |
| | <i>bla_{OXA}</i> | 34Pae23 | 99.87 | CP017969 | 6803885..6804673 |
| | <i>bla_{KPC}</i> | p34Pae23 | 100 | AY034847 | 19503..20384 |
| | <i>bla_{TEM}</i> | p34Pae23 | 99.82 | AM183304 | 17622..18191 |

* 34Pae23 = cromosoma, p34Pae26 = plásmido de 42.977 pb

Anexo 2. Mecanismos de resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* encontrados en este aislamiento.

| Mecanismo de resistencia | Gen de resistencia | Cantidad de copias | Ubicación | Posición en genoma | Acceso | Identidad |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|------------------|--------------------|----------------|----------------|
| Impermeabilidad de la membrana | <i>oprD</i> | 8 | 34Pae23 | 189276..190610 | WP_003090815.1 | 100 |
| | | | 34Pae23 | 221598..220240 | WP_043107837.1 | 100 |
| | | | 34Pae23 | 2466486..2465206 | WP_003090815.1 | 100 |
| | | | 34Pae23 | 2609268..2607961 | WP_003090563.1 | 100 |
| | | | 34Pae23 | 2850766..2852112 | WP_003089861.1 | 100 |
| | | | 34Pae23 | 2977018..2975600 | WP_003089648.1 | 100 |
| | | | 34Pae23 | 4841979..4843481 | CRN59234.1 | 100 |
| | | | 34Pae23 | 5474702..5476153 | WP_073660276.1 | 100 |
| | <i>oprB</i> | 3 | 34Pae23 | 950709..952013 | WP_003093407.1 | 99.77 |
| | | | 34Pae23 | 2010430..2011794 | WP_128568929.1 | 100 |
| | | | 34Pae23 | 3146182..3147540 | WP_015502915.1 | 100 |
| | <i>oprF</i> | 1 | 34Pae23 | 903732..3904784 | WP_003087843.1 | 100 |
| | Bombas de eflujo | <i>oprM</i> | 4 | 34Pae23 | 513326..514783 | WP_003084633.1 |
| 34Pae23 | | | | 2390374..2388935 | WP_003090923.1 | 100 |
| 34Pae23 | | | | 4768214..4766733 | WP_003086193.1 | 100 |
| 34Pae23 | | | | 6398007..6399485 | WP_003118019.1 | 100 |
| <i>tolC</i> | | 2 | 34Pae23 | 900019..898604 | WP_014604038.1 | 100 |
| | | | 34Pae23 | 4469210..4470658 | MBG5027775.1 | 99.79 |
| <i>opmE</i> | | 1 | 34Pae23 | 1595709..1597184 | WP_003092061.1 | 100 |
| <i>oprJ</i> | | 1 | 34Pae23 | 5678541..5677102 | WP_124129982.1 | 99.79 |
| <i>mexAB</i> | | 1 | 34Pae23 | 509017..513324 | WP_003084631.1 | 100 |
| <i>mexVW</i> | | 1 | 34Pae23 | 5339252..5343489 | WP_003094023.1 | 100 |
| <i>mexCD</i> | 1 | 34Pae23 | 5682770..5678547 | WP_003094838.1 | 90.19 | |
| Betalactamasas | <i>ampC</i> | 1 | 34Pae23 | 942754..943947 | WP_003093423.1 | 100 |
| | <i>ampD</i> | 1 | 34Pae23 | 5501505..5500939 | WP_003094640.1 | 100 |
| | <i>dacB</i> | 1 | 34Pae23 | 2168880..2170310 | AEO74399.1 | 100 |
| | <i>ampR</i> | 1 | 34Pae23 | 944096..944986 | WP_003132323.1 | 100 |
| Modificación del blanco | <i>gyrA</i> | 1 | 34Pae23 | 2028505..2031276 | MBX6202918.1 | 99.89 |
| | <i>gyrB</i> | 1 | 34Pae23 | 3793..6213 | WP_003097268.1 | 100 |
| | <i>parC</i> | 1 | 34Pae23 | 6153035..6150771 | WP_132748411.1 | 99.87 |
| | <i>parE</i> | 2 | 34Pae23 | 5604521..5604880 | WP_012076884.1 | 100 |
| | | | 34Pae23 | 6156466..6154577 | WP_003095690.1 | 100 |

Anexo 3. Comparación esquemática de los alineamientos pareados entre el elemento genético móvil presente en el plásmido p34Pae23 y los diferentes NTE_{KPC} reportados hasta la fecha a) Ia b) Ib c) Ic d) Id e) IIa f) IIb g) IIc h) IId i) III.



Anexo 4. Resultados del MLST (Multi-Locus Sequence type) en el 34Pae23; mediante el uso de la plataforma PubMLST (Jolley et al., 2018)

| Locus | Alelo | Longitud | Contig | Posición inicial | Posición final |
|----------------------|-------|----------|---------|------------------|----------------|
| <i>acsA</i> | 38 | 390 | 34Pae23 | 4916345 | 4916734 |
| <i>aroE</i> | 11 | 498 | 34Pae23 | 26501 | 26998 |
| <i>guaA</i> | 3 | 373 | 34Pae23 | 1303648 | 1304020 |
| <i>mutL</i> | 13 | 442 | 34Pae23 | 6129266 | 6129707 |
| <i>nuoD</i> | 1 | 366 | 34Pae23 | 2687996 | 2688361 |
| <i>ppsA</i> | 2 | 370 | 34Pae23 | 3910575 | 3910944 |
| <i>trpE</i> | 4 | 443 | 34Pae23 | 711439 | 711881 |
| Pulsotipo encontrado | | | | ST235 | |