



**Caracterización de perfiles de elementos
genéticos plasmídicos de aislamientos
colombianos de *Providencia rettgeri*, causantes
de IAAS. Obtenidos del Instituto Nacional de
Salud, durante el periodo 2015-2016**

Laura Viviana Rojas Suárez

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Posgrado Interfacultades
Maestría en Ciencias -
Microbiología
Bogotá, Colombia
2019

Caracterización de perfiles de elementos
genéticos plasmídicos de aislamientos
colombianos de *Providencia rettgeri*, causantes
de IAAS. Obtenidos del Instituto Nacional de
Salud, durante el periodo 2015-2016

Laura Viviana Rojas Suárez

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para
obtar al título de:

Magíster en Ciencias - Microbiología

Director (a):

M.Sc Ma.Teresa Jesús Reguero Reza

Codirector (a):

Ph.D Emiliano Barreto-Hernández

Línea de Investigación:

Epidemiología Molecular de Agentes Infecciosos

Grupos de Investigación:

Epidemiología Molecular y Bioinformática

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Posgrado Interfacultades

Maestría en Ciencias -

Microbiología

Bogotá, Colombia

2019

Dedicado a mis padres por su apoyo y amor incondicional.

*” Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.
Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico; es también
un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan
como un cuento de hadas.”*

Marie Curie

Agradecimientos

El éxito de un grupo de investigación se da en consolidar ideas que apunten hacia el futuro, la creación de proyectos novedosos y de actualidad, el esfuerzo de integrar distintos campos del conocimiento y la integralidad de todo el equipo profesional, por tanto quiero hacer mención y agradecer a los profesores Emiliano Barreto y María Teresa Reguero por permitirme ser parte de su grupo de investigación, asimismo por la orientación consejos, comentarios y atención presentadas durante mi proceso de formación en el cual adquirí conocimientos invaluable. A mis compañeros de maestría que también hacen parte de este grupo de investigación: Karen Aguilar, María Caridad Tenorio, Mishelle Cuello, Camila Lugo y Diego Talero, con quienes compartí proyectos e ilusiones, gracias por los conocimientos compartidos, sugerencias y consejos, por los momentos divertidos y por el apoyo prestado durante mi vivencia universitaria. A Socorro Prieto quien en su momento me auxilió y me apoyó en los momentos difíciles y más que un apoyo administrativo fue una luz y una guía.

Agradezco al Instituto Nacional de Salud quienes proveyeron los aislamientos de estudio. A el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por brindarme los espacios y el material para desarrollar esta investigación.

Igualmente quiero agradecer a mis padres quienes me apoyaron con la misma tenacidad con la que me han apoyado en cada proyecto que he emprendido, gracias por el carácter que han infundado en mí y la sed de conocimiento que me han inculcado, siempre con el mismo amor. Gracias.

Resumen

Providencia rettgeri es un bacilo Gram negativo generalmente ubicuo reconocido por causar principalmente infecciones a nivel de tracto urinario y otras infecciones aisladas a nivel de tracto respiratorio y enfermedades gastrointestinales. No obstante ha cobrado relevancia en la última década debido a varios reportes de baja sensibilidad a antimicrobianos por la adquisición de genes determinantes como *bla_{N_{DM-1}}*. La adquisición de elementos genéticos extracromosomales altamente divergentes le han proporcionado un arsenal genético presente en otras bacterias Gram negativas a través de la transferencia horizontal de genes. Así, *P. rettgeri* se ha convertido en un patógeno nosocomial emergente que se ha extendido por todo el planeta.

Por lo anterior, el presente estudio se propuso caracterizar perfiles de elementos genéticos plasmídicos de resistencia presentes en 28 aislamientos de *P. rettgeri* que presentan un fenotipo multirresistente, a través de un flujo de trabajo bioinformático basado en cinco metodologías distintas que permitieron la obtención de secuencias posiblemente asociadas a plásmidos. Estas secuencias fueron obtenidas a partir lecturas cortas adquiridas de una previa secuenciación del genoma completo (WGS) de cada uno de los aislamientos.

Este estudio logró determinar la presencia de plásmidos en todos los aislamientos, así mismo se obtuvieron 568 secuencias posiblemente plasmídicas en donde se identificaron 41 genes asociados a la resistencia a antimicrobianos (el 35 % de genes asociados a la resistencia del genoma completo), donde la mayoría tenían un mecanismo de degradación y modificación de antibióticos. Igualmente se definieron los perfiles de resistencia asociados a posibles secuencias plasmídicas para cada uno de los aislamientos y se advirtió la divergencia presentada por ellas.

Keywords: *Providencia rettgeri*, plásmidos, *contigs*, Secuenciación de Genoma Completo (WGS), *pipeline*, resistencia a antimicrobianos (RAM), perfil genotípico de resistencia.

Índice general

1. Marco Teórico	4
1.1. <i>Providencia rettgeri</i>	4
1.1.1. Factores de virulencia	5
1.1.2. Mecanismos de resistencia de <i>Providencia rettgeri</i>	6
1.2. Plásmidos	10
1.2.1. Plásmidos como Elementos Genéticos Móviles (EGM's)	10
1.2.2. Replicación plasmídica	11
1.2.3. Plásmidos asociados a resistencia antimicrobiana y virulencia en cepas de <i>Providencia rettgeri</i>	12
1.2.4. Transposones y Secuencias de inserción	15
1.3. Plasticidad plasmídica de <i>Providencia rettgeri</i>	17
1.4. Epidemiología de <i>Providencia rettgeri</i>	19
1.5. Detección y caracterización de plásmidos a partir de secuenciación de genoma completo y el uso de herramientas bioinformáticas	20
2. Identificación de la presencia de plásmidos en aislamientos de <i>P. rettgeri</i>	24
2.1. Introducción	24
2.2. Metodología	25
2.2.1. Material Biológico	25
2.2.2. Área de estudio	25
2.2.3. Identificación de los aislamientos criopreservados	27
2.2.4. Extracción de DNA Plasmídico	27
2.2.5. Cuantificación de DNA	28
2.3. Resultados y Discusión	28
2.3.1. Área de estudio	28
2.3.2. Datos de las muestras	29
2.3.3. Comprobación microbiológica	32
2.3.4. Obtención de DNA plasmídico	34

3. Determinación de las características genéticas de los contigs asociadas a la resistencia en <i>P. rettgeri</i>	40
3.1. Introducción	40
3.2. Metodología	41
3.2.1. Construcción del pipeline	41
3.2.2. Anotación de los elementos genéticos en <i>contigs</i> plasmídicos de <i>P. rettgeri</i>	44
3.2.3. Determinación de los genes de resistencia en <i>contigs</i> plasmídicos de <i>P. rettgeri</i>	45
3.3. Resultados y discusión	45
3.3.1. Ensamblaje de genomas de <i>P. rettgeri</i>	45
3.3.2. Obtención de contigs de <i>P. rettgeri</i> asociados a plásmidos	48
3.3.3. Identificación de elementos plasmídicos mediadores de resistencia	54
3.3.4. Perfiles de elementos genéticos plasmídicos asociados a la resistencia a antibióticos de 28 aislamientos de <i>P. rettgeri</i>	57
4. Determinación de las relaciones genéticas entre los perfiles plasmídicos obtenidos y los de otras cepas de <i>P. rettgeri</i> previamente reportadas	65
4.1. Introducción	65
4.2. Metodología	66
4.2.1. Determinación de relaciones entre los perfiles plasmídicos	66
4.2.2. Determinación de los elementos genómicos de resistencia presentes en los perfiles plasmídicos	66
4.2.3. Análisis comparativo de contigs asociados a plásmidos y secuencias de referencia de plásmidos reportados en <i>Providencia rettgeri</i>	66
4.2.4. Asignación de posibles familias de Incompatibilidad a consolidados de contigs de <i>P. rettgeri</i> obtenidas del pipeline	67
4.3. Resultados y discusión	67
4.3.1. Análisis comparativo entre secuencias asociadas a plásmidos de los 28 aislamientos de <i>P. rettgeri</i>	67
4.3.2. Análisis y comparación de los perfiles de resistencia plasmídicos de 28 aislamientos de <i>P. rettgeri</i>	73
4.3.3. Análisis comparativo con secuencias de plásmidos de <i>P. rettgeri</i> reportadas	84
5. Conclusiones y Recomendaciones	90
5.1. Conclusiones	90
5.2. Recomendaciones	91

A. Concentración de DNA plasmídico.....	92
B. datos sociodemográficos	93
C. Ensamblaje y anotación de los genomas.....	95
D. consolidado de <i>contigs</i> asociados a plásmidos	97
E. Scripts.....	114
Referencias	115

Índice de figuras

1.1. Organización de plásmidos NDM-1 positivos de <i>P. rettgeri</i> ...	14
1.2. Transposones y secuencias de inserción reportadas en plásmidos de <i>P. rettgeri</i> . Tomado de (Marquez-Ortiz et al., 2017a)	16
1.3. Tecnologías de secuenciación masiva	21
2.1. Área de estudio. 2015: Cundinamarca, Valle de Cauca y Risaralda. 2016: Risaralda, Sucre y Santander.	25
2.2. Aislamientos por año y departamento	29
2.3. Aislamientos por origen de muestra	30
2.4. Aislamientos por diagnóstico	31
2.5. Aislamientos por grupo etario	32
2.6. Colonias <i>P. rettgeri</i> en medio LEEDS. A: muestra el control positivo a partir de la siembra de una ATTCC de <i>Acinetobacter baumannii</i> BAA-605 representada por colonias rosa. B: muestra el crecimiento de colonias marrón de un aislamiento de <i>P. rettgeri</i> GMR-RA14.	33
2.7. Colonias <i>P. rettgeri</i> en agar MacConkey. Muestra la no fermentación de la lactosa del aislamiento GMR-RA43. Todos los aislamientos fueron sembrados por el método de aislamiento, con el fin de obtener colonias puras y asiladas para comenzar el proceso de extracción de DNA plasmídico. ...	34
2.8. Obtención de DNA plasmídico de 28 aislamientos de <i>P. rettgeri</i> . La electroforesis fue preparada en gel de agarosa al 1% y corrida en buffer TAE (Tris-Ácido acético-EDTA) al 1X, el cual contiene un total de 30 pozos. V517: patrón de peso molecular para plásmidos, relacionado en la parte izquierda de la foto. C-: control negativo de agua HPLC.	35

- 2.9. Dendograma de agrupamiento de los plásmidos extraídos de los 28 aislamientos de *P. rettgeri*. Agrupamiento de acuerdo al patrón de bandas de DNA plasmídico de 28 muestras de *P. rettgeri*, observadas en la electroforesis en gel de agarosa, realizado con el algoritmo UPGMA de PyElph v1.4, donde se muestran tres agrupamientos representados por los clados A (en color verde), B (en color naranja) y C (en color azul). 37
- 3.1. Flujo de trabajo para la clasificación de posibles *contigs* asociados a plásmidos. Cuadros azules: cinco métodos de clasificación empleados por el *pipeline* y cinco órdenes de selección, consolidación, disposición, anotación y comparación de los datos. Cuadros naranja: *fastq_file reads*, el ensamblaje del genoma completo con la obtención de un grupo de *contigs* indiscriminados por aislamiento y los alineamientos contra los *contigs* de PlasmidSPAdes y contra las bases de datos: Plásmidos y Cromosomas. 44
- 3.2. Restricción del método para la selección de *contigs* asociados a plásmidos, a partir del uso de *bla_{NDM-1}* como indicador. En Morado: el porcentaje del total de *contigs* NDM-1 asignados por método, a partir del 100 % de *contigs*-NDM-1 que fueron clasificados como plasmídicos (n=27). 50
- 3.3. Perfil de resistencia plasmídico por departamento de 28 aislamientos *P. rettgeri* 58
- 3.4. Genes de resistencia asociados a *bla_{NDM-1}*. En amarillo: Genes mediadores de resistencia mayormente asociados a *bla_{NDM-1}* de 27 aislamientos de estudio y en azul: Genes mediadores de resistencia que se encuentran en menor medida asociados a *bla_{NDM-1}* de 27 aislamientos de estudio. %: porcentaje de aislamientos en los que se encuentra cada gen de resistencia encontrado. 59
- 3.5. Perfil plasmídico de genes asociados a la resistencia a distintas familia de antibióticos de 28 aislamientos *P. rettgeri*. En verde: Genes mediadores de resistencia a sulfonamidas y diaminopirimidinas; en naranja: Genes mediadores de resistencia a fluoroquinolonas; en morado: Genes mediadores de resistencia a tetraciclinas; en negro: Genes mediadores a la resistencia a macrólidos; en gris: genes mediadores a la resistencia a fenoles; en amarillo: Genes mediadores de resistencia a aminoglucósidos y en azul: Genes mediadores a la resistencia a antibióticos β -lactámicos. %: porcentaje de aislamientos en los que se encuentra cada gen de resistencia encontrado. 63

4.1. Árbol de perfiles plasmídicos de 28 aislamientos colombianos de <i>P. rettgeri</i>	70
4.2. Comparación del árbol de perfiles plasmídicos de <i>P. rettgeri</i> y el dendograma realizado a partir de extracciones de plásmidos de los 28 aislamientos de <i>P. rettgeri</i> . A: Dendograma inferido por el patrón de bandas observadas en la electroforesis, donde se observan 3 grupos representados por las letras A (cuadro verde), B (cuadro naranja) y C (cuadro azul). B: Árbol inferido por Roary, donde los cuadros azules, naranjas y verde, refieren los consolidados de <i>contigs</i> posiblemente plasmídicos versus los agrupamientos inferidos por los patrones de bandas.	71
4.3. Árbol filogenético de genomas colombianos de <i>P. rettgeri</i> . Tomado y modificado de: "Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia de antibióticos β -lactámicos de <i>Providencia rettgeri</i> durante el periodo 2015-2016"	72
4.4. Perfil genético de resistencia asociado a secuencias plasmídicas de <i>P. rettgeri</i> . <i>Heatmap</i> donde los genes calificados como "Perfect" son aquellos que superan un <i>bit score</i> calculado por RGI y tienen un porcentaje de identidad de 100 %, se encuentran de color amarillo. Los genes calificados como "Strict" son aquellos que superan el <i>bit score</i> , pero que tienen un porcentaje de identidad menor 100 %, se encuentran en color blanco. %: porcentaje de genes asociados a la resistencia a antimicrobianos presentes en el perfil plasmídico. El color morado indica la ausencia de genes.	74
4.5. Perfil fenotípico de resistencia a antibióticos β -lactámicos de 28 secuencias genómicas de <i>P. rettgeri</i> . Tomado de: "Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia de antibióticos β -lactámicos de <i>Providencia rettgeri</i> durante el periodo 2015-2016"	77
4.6. Perfil fenotípico de resistencia a antibióticos no β -lactámicos de 28 secuencias genómicas de <i>P. rettgeri</i> . Tomado de: "Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia de antibióticos β -lactámicos de <i>Providencia rettgeri</i> durante el periodo 2015-2016".	78
4.7. Árbol de secuencias plasmídicas de 28 aislamientos de <i>P. rettgeri</i> contra 11 secuencias de referencia de plásmidos reportados	86
4.8. Árbol de secuencias plasmídicas de 28 aislamientos de <i>P. rettgeri</i> contra 11 secuencias de referencia de plásmidos reportados. Inc: Familia de Incompatibilidad; Year: año; Country: País.	88

Índice de tablas

1.1. Mecanismos de resistencia enzimática asociados a plásmidos reportados en <i>P. rettgeri</i>	18
1.2. Plásmidos reportados de <i>Providencia rettgeri</i> en bases de datos primarias y secundarias	21
2.1. Aislamientos de <i>Providencia rettgeri</i> : Comprenden un grupo de cepas causantes de IAAS, todos con un patrón multirresistente a antibióticos como imipenem, meropenem, ertapenem, cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y sulfonamidas-diaminopirimidinas. * SD: Sin Dato	26
3.1. Herramientas Prokka para la anotación de secuencias DNA. Tomado y modificado de (Seemann, 2014).....	45
3.2. Resultados promedios del ensamblaje de los genomas de <i>P. rettgeri</i> con SPAdes	47
3.3. Obtención de <i>contigs</i> asociados a plásmidos en 28 aislamientos de <i>P. rettgeri</i>	49
3.4. Identificación de <i>contigs</i> -NDM-1 asociados a plásmidos en 28 aislamientos de <i>P. rettgeri</i>	49
3.5. <i>contigs</i> seleccionados como posiblemente plasmídicos. En rosa: conjunto de <i>contigs</i> que habían sido identificados inicialmente con un parámetro de restricción de 3 herramientas de 5. En Azul: conjunto de <i>contigs</i> que habían sido identificados inicialmente al actualizar la base de datos de plásmidos. En Amarillo: conjunto de <i>contigs</i> que no habían sido identificados con ninguna de las dos estrategias anteriores pero si con un parámetro de restricción final de 2 herramientas de 5. Adicionalmente Los <i>contigs</i> resaltados en esos colores son aquellos que albergan el gen <i>bla_{NDM-1}</i>	51

3.6. <i>contigs</i> -NDM que presentan los mismos tamaños en pb con otros aislamientos <i>P. rettgeri</i>	52
3.7. Comparación del número de plásmidos obtenidos mediante la extracción y plásmidos determinados por PlasmidSPAdes	53
3.8. Genes de resistencia asociados a cambios en el sitio blanco encontrados en <i>contigs</i> posiblemente asociados a plásmidos, en 28 aislamientos de <i>P. rettgeri</i> . %: porcentaje de aislamientos en los que se encuentra cada gen de resistencia encontrado. ...	54
3.9. Genes de resistencia asociados a degradación y modificación del antibiótico encontrados en <i>contigs</i> posiblemente asociados a plásmidos, en 28 aislamientos de <i>P. rettgeri</i> . %: porcentaje de aislamientos en los que se encuentra cada gen de resistencia encontrado.	55
3.10. Genes de resistencia asociados a Bombas de Eflujo encontrados en <i>contigs</i> posiblemente asociados a plásmidos, en 28 aislamientos de <i>P. rettgeri</i> . %: porcentaje de aislamientos en los que se encuentra cada gen de resistencia encontrado.	56
4.1. Genes de resistencia compartidos entre GMR-RA218_P y el plásmido de referencia AR.0082 de <i>P. rettgeri</i>	85
4.2. Genes de resistencia compartidos entre GMR-RA1152_P y el plásmido de referencia p16Pre36 de <i>P. rettgeri</i>	87

Introducción

Actualmente el surgimiento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos se ha presentado como un peligro latente en salud pública a nivel mundial, esta situación ha complicado el tratamiento de infecciones causadas por estas bacterias sobre todo en ambientes hospitalarios de alta complejidad. En consecuencia la morbilidad y la mortalidad en pacientes afectados han acompañado el proceso de resolución en la mayoría de los casos de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS). Estas cepas emergentes amenazan con propagar dicha resistencia y otros mecanismos adaptativos a cada vez más especies y géneros bacterianos que, con el tiempo prestarán resistencia a antimicrobianos desarrollados en la actualidad (WHO, 2018), lo que genera un desafío importante para la comunidad médica y científica. Frente a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado una lista de patógenos para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos clasificada de acuerdo a la prioridad, donde figura la familia *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos y productoras de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEES) como prioridad crítica, adicionalmente el objetivo dos del plan de acción mundial propone "reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación " con el fin de entender, aportar y proponer nuevas soluciones para combatir esta problemática (WHO, 2018).

La resistencia antimicrobiana es generalmente adquirida por las bacterias gracias a elementos genéticos móviles o EGM's, moléculas de DNA extra-cromosomales que tienen la capacidad de invadir, replicarse y diseminarse gracias a la maquinaria celular de una célula huésped, además de conceder ventajas evolutivas. Dentro de estos EGM's, los plásmidos juegan un papel central en la diseminación de genes de resistencia, tanto así, que para inicio de la década de los 2000, ya se había reportado la resistencia a quinolonas debido a la transferencia horizontal de genes *qnr* en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, además de mutaciones en el cromosoma (Pfeifer et al., 2010). Hoy, la resistencia a cefalosporinas de tercera generación reportadas en especies como *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *E. coli*, *Salmonella spp* entre otras, son cada vez más comunes (Pfeifer et al., 2010); de hecho, la presen-

cia de genes resistentes a antibióticos carbapenémicos (Fármacos de última generación utilizados como tratamiento de última opción) han comenzado a reportarse en algunas Enterobacterias.

Recientemente, especies de Enterobacterias como *Providencia suarti* y *Providencia rettgeri* se han visto involucradas en infecciones intrahospitalarias graves, de las cuales *P. rettgeri* ha sido responsable de sepsis neonatal (Sharma et al., 2017), infecciones complicadas del tracto urinario (Sagar et al., 2017), neumonía, meningitis y endocarditis (O'Hara et al. 2000; Müller 1986). Estos casos en particular han mostrado un fenotipo multirresistente a carbapenémicos debido a la presencia de la enzima Nueva Delhi Metallo β -lactamasa (NDM-1) asociada a plásmidos, por lo anterior *Providencia rettgeri* ha cobrado cada vez más importancia debido al cambio en su perfil de sensibilidad.

Para el año 2011 se aisló por primera vez en Israel una cepa de *P. rettgeri* multirresistente denominada H1736 NDM-1 positiva, esta consiste en un genoma de 4.6 Mpb y al menos cinco plásmidos descritos, fagos, islas genómicas y elementos integradores y conjugativos (Olaitan et al., 2015). La adquisición de operones de biosíntesis para carbapenémicos y genes de virulencia obtenidos en eventos de transferencia horizontal de genes, fueron asociados a la resistencia de al menos 27 antibióticos distintos (Olaitan et al., 2015). Posteriormente se reportó una cepa de *P. rettgeri* resistente a β -lactámicos, está por su parte consiste de 4.8Mpb y contiene un megaplásmido de 108Kpb NDM-1 positivo e islas genómicas (Carver et al., 2005). Gracias al comportamiento de diseminación de las Enterobacterias en general, no tardó mucho en presentarse los primeros casos de cepas NDM-1 positivas en Latinoamérica: México (Barrios et al., 2013), Brasil (Carmo Junior et al., 2015) y Colombia (Marquez-Ortiz et al., 2017b).

Aunque la presencia del gen *bla*_{NDM-1} que codifica para la enzima Nueva Delhi Metallo β -lactamasa, está habitualmente asociada a plásmidos también se han encontrado otros plásmidos que juegan un rol "auxiliar" que podrían ayudar a la movilización del plásmido NDM-1 (Barrios et al., 2013). Adicionalmente, los reportes de resistencia parecen variar de acuerdo a el tamaño de los plásmidos presentes en distintas cepas de *P. rettgeri* multirresistentes en un rango relativamente amplio que va desde 108kpb a 150kpb (Bocanegra-Ibarias et al., 2017); esto podría deberse a que dichos plásmidos están en un estado continuo de rearreglamiento a lo largo del tiempo (Aschbacher et al., 2008); además, la diseminación de genes resistentes no solo podría atribuirse a eventos de transferencia horizontal de genes sino también a la expansión clonal de cepas multirresistentes (Bocanegra-Ibarias et al., 2017).

De igual forma, los grupos de investigación de Epidemiología molecular y Bioinformática de la Universidad Nacional de Colombia - sede Bogotá, han realizado un estudio previo llamado "*Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri* durante el periodo 2015-2016*", sobre el perfil de resistencia en *P. rettgeri* a partir secuencias de su genomas completo. Gracias

a un flujo de trabajo bioinformático ese estudio identificó y evaluó elementos genómicos de resistencia a antibióticos β -lactámicos, determinó el perfil fenotípico de la resistencia, tipificó 28 aislamientos clínicos y estableció las relaciones filogenéticas correlacionando el perfil genómico y fenotípico. Dentro del aporte de ese estudio está el hallazgo de multiresistencia a distintos tipos de antibióticos como carbapenémicos, cefalosporinas, sulfonamidas y fluoroquinolonas, la identificación de 8 secuentipos ribosomales nuevos, 116 genes mediadores de resistencia, el indicio de una amplia dispersión de estas cepas en Colombia y la paridad de la predicción de resistencia para antibióticos β -lactámicos y no β -lactámicos entre ambos perfiles.

Paralelamente, el desarrollo en nuevas tecnologías de caracterización microbiológica ha venido superando las limitantes en el diagnóstico clínico de manera exponencial. Sin embargo, aunque aún se siguen usando tecnologías de caracterización fenotípica de la resistencia a antibióticos en infecciones graves, el uso de la Secuenciación de genoma completo de Nueva Generación (NGS) y el análisis de los datos genómicos obtenidos involucrados en la resistencia, a través de herramientas bioinformáticas, ha aportado datos certeros y confiables del dinamismo genético, acercándose más a la caracterización de la resistencia que presentan las cepas causantes de IAAS (Cloud et al., 2010). Así, las herramientas moleculares y bioinformáticas constituyen una revolución en el entendimiento del entorno genético de diversos microorganismos, donde la información obtenida puede usarse en la praxis para controlar las variantes que llevan a la potencial resistencia a antibióticos en cepas bacterianas (Cloud et al., 2010).

Por lo anterior, el presente trabajo pretende caracterizar los perfiles genéticos plasmídicos de resistencia a antibióticos presentes en aislamientos colombianos de *Providencia rettgeri*, obtenidos del Instituto Nacional de Salud (INS) durante el periodo 2015-2016 a partir de:

1. Identificación de la presencia de plásmidos en los aislamientos de *Providencia rettgeri*.
2. Determinación de las características genéticas de los *contigs* asociadas a resistencia a antibióticos en *Providencia rettgeri*.
3. Determinación de las relaciones genéticas entre los perfiles plasmídicos obtenidos y los de otras cepas de *Providencia rettgeri* previamente reportadas.

Estos objetivos se desarrollaran en los capítulos dos, tres y cuatro de este documento.

Capítulo 1

Marco Teórico

1.1. *Providencia rettgeri*

Providencia rettgeri es una de las especies del género *Providencia spp.* clasificada dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, fue descrita por primera vez por Rettger en 1909 durante una epidemia tipo cólera en pollos jóvenes que morían en un lapso de 14 días por "diarrea blanca" o "septicemia fatal" (Wray and Wray, 2000); actualmente se describe como un bacilo Gram negativo móvil, con flagelos peritricos, anaerobio facultativo y productor de gas (Manos and Belas, 2006). En términos bioquímicos todas las especies de este género tienen la capacidad de desaminar la fenilalanina y la mayoría utiliza glucosa y lactosa como fuente de carbono; no obstante *P. rettgerii* es una especie capaz de metabolizar el citrato y es además la única capaz de hidrolizar la urea (Koneman et al., 1997).

Todas las especies de este género son patógenos oportunistas y están habitualmente asociadas a infecciones en humanos y animales (Chander et al., 2006); Sin embargo, *P. rettgeri* habitualmente está relacionada como una especie oportunista que puede causar enfermedad en pacientes inmunocomprometidos. No obstante, también ha sido asociada a diarreas del viajero e infecciones oculares en pacientes inmunocompetentes (Müller 1986; Yong et al. 2009). Además puede causar infecciones en el tracto urinario por su capacidad de formar biofilm, esto implica una amenaza en aquellos pacientes con uso prolongado de catéteres uretrales ya que puede causar bacteriuria asintomática asociada a catéter (CA-ASB) y/o infecciones del tracto urinario asociada a catéter (CA-UTI), lo que actualmente la está convirtiendo en una especie potencialmente peligrosa en los establecimientos hospitalarios donde se han reportado brotes que muestran perfiles de resistencia a antibióticos β -lactámicos evidenciando la producción de β -lactamasas de espectro extendido o BLEES de tipo AMPc, TEM, SHV ó CTX-M (Tumbarello et al., 2004) principalmente en aislamientos clínicos de *P. rettgeri* causantes de infecciones del tracto urinario (Sagar et al., 2017), aunque también se han reportado en

infecciones de tracto respiratorio, sangre (O'Hara et al. 2000; Mahrouki et al. 2015), quemaduras, heridas, meningitis, endocarditis (Sharma et al., 2017) y gastroenteritis (Chander et al., 2006).

Recientemente el comportamiento resistente de *P. rettgeri* está relacionado con la transferencia horizontal de genes RAM (Resistentes a Antimicrobianos) albergados en plásmidos conjugativos que se diseminan entre géneros, como por ejemplo *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* y *Klebsiella pneumoniae* (Tumbarello et al. 2004; Yong et al. 2009; Marquez-Ortiz et al. 2017a); y entre géneros de otras familias bacterianas como es el caso de *Acinetobacter baumannii*, que por lo general están asociadas a brotes seguidos en distintas unidades de atención médica. Además, el perfil de resistencia de *P. rettgeri* comprende la resistencia intrínseca a varios antimicrobianos tales como la penicilina, gentamicina, trombamicina, amikacina y cefalosporinas de primera generación, además de la polimixina y tigeciclina (Magiorakos et al. 2012; O'Hara et al. 2000). Por tal razón se ha sumado a la emergente problemática mundial en salud pública.

Algunos hallazgos sugieren que la aparición de estas nuevas cepas bacterianas está relacionada al uso indiscriminado de antibióticos, el tratamiento empírico por parte de la comunidad médica y al uso de los mismos como aditivos en alimentos para animales de consumo humano, donde además recolectan estiércol y compost para uso agrícola (Chander et al., 2006). Esto ha generado un ambiente de presión selectiva en el intestino de dichos animales, generando especies multirresistentes en sus heces; entre las que se encuentra *P. rettgeri*. En consecuencia, también se ha vinculado la transmisión de este patógeno al ser humano a través del consumo de estos alimentos (Smith et al. 2003; Van den Bogaard et al. 2001).

1.1.1. Factores de virulencia

Se han descrito dos factores de virulencia esenciales para la colonización y posterior desarrollo de la infección, compartidas por dos de las cinco especies de *Providencia spp*, que están fundamentalmente relacionadas con infecciones del tracto urinario. Cabe señalar, que un factor importante como se mencionó anteriormente, es el uso de catéteres uretrales en pacientes con hospitalizaciones prolongadas que pueden desencadenar en infecciones a nivel sistémico.

Aunque el género *Providencia spp* no comparte la motilidad en sustratos sólidos con otras Enterobacterias, estas pueden expresar una fimbria de tipo hemaglutinina MR/K que aumenta la capacidad de adhesión que tiene *P. rettgeri* y *P. stuartii* a las células del epitelio para colonizar el tejido blanco, sobre todo en infecciones de larga duración donde se ha informado la MR/K sobre expresada, lo que diferencia este tipo de infecciones de otras ya que son mayormente persistentes (Manos and Belas, 2006).

Por otro lado para mantener un ambiente óptimo del nicho bacteriano, *P. rettgeri* despliega ureasas lo cual le permite incrementar el pH del medio por la hidrólisis de la urea en amonio y dióxido de carbono y con ello extender la colonización; esto ha contribuido en la evolución de infecciones urinarias a pielonefritis y bacteriemias. El uso de esta enzima le ha conferido una ventaja adaptativa que le permite ser la especie dominante en infecciones causadas por dos o más especies bacterianas (Manos and Belas, 2006).

1.1.2. Mecanismos de resistencia de *Providencia rettgeri*

P. rettgeri expresa generalmente mecanismos de resistencia no enzimáticos como las bombas de eflujo y alteración de porinas, no obstante se han reportado alteraciones en el sitio blanco por modificación o degradación de ciertos antibióticos, gracias a genes codificantes de enzimas presentes en elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones y secuencias de inserción, lo que ha resultado en la aparición de cepas bacterianas que son resistentes y multirresistentes. A continuación se mencionan cada uno de estos mecanismos.

1.1.2.1. Mecanismos de resistencia no enzimática

Bombas de Eflujo

Estas proteínas transmembranales cumplen una función autoinmune regulando la homeostasis del citoplasma y de resistencia antimicrobiana expulsando compuestos tóxicos hacia el espacio extracelular (Marchetti et al., 2011), también se han visto involucradas en la comunicación celular regulando la quimiotaxis (Lynch, 2006). Existen bombas de eflujo específicas para distintos tipos de compuestos que pueden excretar o transformar dichos compuestos, en este punto las proteínas de membrana cumplen un papel importante en la resistencia antimicrobiana ya que expulsan compuestos antimicrobianos y evitan el ingreso de los mismos. Cabe resaltar de igual forma que este tipo de bombas de eflujo pueden estar intrínsecas en el microorganismo o pueden ser adquiridas (Saier JR et al., 1998).

En *P. rettgeri* algunas bombas de eflujo se han visto sobre expresadas e involucradas como mecanismos de acción frente a carbapenémicos como el meropenem (Abdallah and Balshi, 2018). En un estudio realizado por los grupos de investigación de Epidemiología molecular y Bioinformática de la Universidad Nacional de Colombia en el año 2019 titulado "Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri* durante el periodo 2015-2016",

se encontró que las bombas de eflujo más prevalentes en 28 cepas estudiadas eran EmrAB-TolC, RosAB, emrD, mdtH, MacAB-TolC y MdtABC-TolC, asociadas a la resistencia a familias de antibióticos como fluoroquinolonas, macrólidos, cefalosporinas, tetraciclinas, rifamicinas, fenoles y carbapenémicos.

Alteración de las Porinas

La alteración o la pérdida de las porinas en la membrana externa de las células procariotas, es importante porque regulan la entrada y la salida de ciertas moléculas, actuando como filtros de membrana permeable de las bacterias Gram negativas retardando la entrada de elementos dañinos para la célula. La especificidad de estas proteínas también confiere resistencia a distintas clase de antimicrobianos y por lo tanto la mutación en los genes que las codifican pueden hacer que estas se cierren o modifiquen su estructura para evitar la entrada de los antibióticos (Tafur et al., 2011).

Las distintas posibilidades de entrada que se manifiestan en las membranas bacterianas hacen que las diferentes familias de antimicrobianos posean especificidades de anclaje a la célula blanco, como en el caso del imipenem donde la resistencia puede ser dependiente al cierre o modificación de las porinas (Tafur et al., 2011). Así, Las modificaciones en las bombas de eflujo y las porinas son importantes también para explicar la resistencia a antimicrobianos como: tetraciclinas, eritromicina, cloranfenicol, quinolonas y β -lactámicos. Esta alteración en la permeabilidad por lo general se da gracias a la modificación del gradiente de electrones, lo cual dificulta la entrada de antibióticos como los aminoglucósidos que utilizan rearrreglos del lipopolisacárido de la célula (Vignoli and Seija, 2007).

En *P. rettgeri* como también en *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* y *P. alcalifaciens*, se han caracterizado por tener una proteína porina única y altamente hidrófoba relacionada con la resistencia a varios antibióticos, lo que resulta evidente ya que son microorganismos estrechamente relacionados que alguna vez fueron clasificados en una sola especie bacteriana (Mitsuyama et al., 1987).

Proteínas de unión a la penicilina

El mecanismo antibiótico de estos agentes se da a partir del reconocimiento de proteínas de membrana, encargadas de unir los enlaces cruzados entre las cadenas peptídicas para la síntesis del peptidoglicano. Estas proteínas son conocidas como Proteínas de unión a la Penicilina o PBP por sus siglas en inglés. Las PBP se encuentran únicamente en la membrana citoplasmática de las células procariotas, por tanto las penicilinas inhiben la síntesis de la membrana bacteriana haciendo que la célula se debilite y estalle debido al

aumento de la permeabilidad celular (Gordon et al., 2000). Sin embargo se ha reportado algunas cepas de *Providencia spp* que ostentan modificaciones en sus PBP cuando el mecanismo de resistencia esta mediado por carbapenemasas, lo cual se correlaciona con fenotipos resistentes a carbapénemicos (Abdallah and Balshi, 2018).

1.1.2.2. Mecanismos de resistencia enzimática

Mecanismos enzimáticos asociados a la resistencia a antibióticos β -lactámicos

Distintas especies bacterianas tienen la capacidad de expresar un arsenal enzimático específico que les permite romper o modificar la estructura química de un agente antimicrobiano, de modo que inactivan el núcleo de la molécula haciendo que pierda su funcionalidad. El ejemplo más común es la hidrólisis del anillo β -lactámico en antibióticos que pertenecen a esa familia; otros en cambio modifican la estructura de los aminoglucósidos ya sea adicionándoles grupos acetilo, adenilo o grupos fosfato. Ambos mecanismos se encuentran presentes en cepas de *Providencia spp* siendo el primero de ellos el de mayor auge en *P. rettgeri* en los últimos diez años (Livermore, 1991).

β -lactamasas de tipo *AmpC*

En general estas enzimas de tipo *AmpC* pueden estar codificadas en genes del cromosoma de las especies *Providencia spp* y en otras especies de las cuales adquiere su nombre: *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp* y *Serratia spp*. Aunque se ha extendido a otros géneros como *Klebsiella spp*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp* a través de Elementos Conjugativos Integradores (ECI) y plásmidos. Estas enzimas pueden sobreexpresarse cuando existen mutaciones en el promotor del gen que pueden alterar la sensibilidad de la cepa en presencia de cantidades mínimas de cefalosporinas de bajo espectro o cefalosporinas de tercera generación (Tafur et al., 2011).

β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE)

Por otra parte estas enzimas β -lactámicas son producidas por bacterias Gram negativas, generalmente de la familia *Enterobacteriaceae*. Algunas de las familias BLEES expresadas en ciertas cepas de *Providencia spp* incluyendo *P. rettgeri* son las TEM, SHV, CTX-M (Barl et al., 2012) y otras menos conocidas como las PER y VEB. Estas se caracterizan por encontrarse en plásmidos, lo que resulta en un alto índice de diseminación entre

especies. Así mismo confieren resistencia a cefalosporinas de bajo espectro, cefalosporinas de tercera generación, oximinocefalosporinas, monobactámicos y penicilinas; pero a diferencia de las *AmpC*, estas pueden ser inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactám (inhibidores de β -lactamasas) (Tafur et al., 2011).

En la mayoría de los casos, la resistencia se incrementa si existen otros mecanismos de resistencia como bombas de eflujo, alteraciones en las porinas o modificaciones en el sitio blanco, como se mencionó anteriormente (Martinez-Martinez, 2007).

Carbapenemasas

Estas enzimas son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de la familia de antibióticos carbapenémicos que son utilizados como última opción terapéutica en infecciones donde están implicadas bacterias BLEE positivas. Estas enzimas se clasifican de acuerdo a su sitio activo en: serín-carbapenemasas y metalo- β -lactamasas que corresponden en la clasificación Ambler en las clases A y D; y B respectivamente (Tafur et al., 2011).

No obstante una nueva carbapenemasa que no entra en ninguna de las clasificaciones mencionadas anteriormente, fue caracterizada por primera vez en 2009 de un aislamiento clínico de *Klebsiella pneumoniae*, esta nueva carbapenemasa fue denominada como Nueva Delhi Metalo- β -lactamasa debido al sitio de origen del paciente (Yong et al., 2009). Esta enzima es codificada por el gen *bla_{NDM-1}*, constituida por 269 aminoácidos con una masa molecular de 27.5 kDa aproximadamente. Su estructura protéica contiene un residuo de alanina entre dos de histidina y comparte ciertas características genéticas con las variantes VIM-1 y VIM-2. NDM-1 confiere resistencia a penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos (Yong et al. 2009; Toleman et al. 2012). La diseminación de NDM-1 ha contribuido a la adquisición de nuevos elementos genéticos de resistencia, que forman clases de resistencia cruzada y pueden ser transferibles por plásmidos (Kumarasamy et al., 2010).

Un hecho claro de lo anterior, es la secuencia del gen codificante que comparte las primeras 19 pares de bases del gen que codifica para la enzima AphA6 (enzima que modifica los aminoglucósidos), lo que indica que el gen *bla_{NDM-1}* puede fusionarse con otros genes de resistencia naturales preexistentes en un cepa bacteriana. Además, la adquisición de un promotor en una cepa *Acinetobacter baumannii* NDM-1 positiva, podría explicar la diseminación rápida entre distintas especies, incluyendo *P. rettgeri*, llevando consigo un arsenal de genes que codifican proteínas que inactivan diversos tipos de antibióticos (Marquez-Ortiz et al. 2017a; Toleman et al. 2012).

Otros Mecanismos Enzimáticos

Las acetiltransferasas, adeniltransferasas, metilasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas están presentes en la mayoría de Enterobacterias y están implicadas en la modificación del sitio de acción de aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Robicsek et al., 2006). Procesos de transporte intracelular llevan estas moléculas al ribosoma, pero son captadas por estas enzimas que, dependiendo a la afinidad al sustrato, pueden acelerar la velocidad de inactivación del fármaco. Estas enzimas pueden expresarse independientemente de la presencia del antibiótico, pero la concentración de las enzimas expresadas si puede estar relacionada con la presión de selección que ejercen estos antimicrobianos. Por tanto, varios de estos antibióticos han venido remplazándose por otros en las últimas décadas (Vignoli and Seija, 2007). Cabe señalar, que las metilasas han jugado un rol importante frente a la resistencia a aminoglucósidos, sobre todo en bacterias no fermentadoras como *A. baumannii* y *P. rettgeri*, que se han encontrado codificadas frecuentemente en plásmidos (Tafur et al., 2011).

1.2. Plásmidos

1.2.1. *Plásmidos como Elementos Genéticos Móviles (EGM's)*

Los plásmidos son moléculas de DNA extra cromosomal que transportan información genética entre células y son capaces de replicarse de manera autónoma. Existen plásmidos lineales y circulares, de doble cadena o de cadena sencilla y pueden oscilar entre 7pb a 10pb e incluso >50pb; estos últimos son llamados megaplásmidos. Fueron reconocidos por primera vez a mediados del siglo XX y en 1977 fueron clasificados en al menos 29 familias de incompatibilidad (Bukhari et al., 1977), determinadas de acuerdo a la coexistencia de dos o más plásmidos en una sola célula, entendiéndose que estos sean capaces de replicarse y mantenerse estables allí, de lo contrario su sistema de replicación es incompatible, en lo cual se basa este sistema de clasificación (Novick, 1987). Estos elementos genéticos confieren ventajas evolutivas frente a otras células competidoras y factores ambientales que le generen estrés como: la producción de bactericidas, enterotoxinas, enzimas de restricción o de modificación y capacidades degradativas del medio, llegando a ser indispensables para el metabolismo de la célula que además confieren rasgos de supervivencia adaptativa. Estos elementos han sido preferentemente asociados con la transferencia horizontal y vertical de genes, incluyendo: resistencia a antimicrobianos, antisépticos, metales y radiación; como también factores de virulencia, gracias a la adquisición de genes que les confieren factores

de adherencia, producción de exotoxinas y factores invasivos (Tolmasky and Alonso, 2015).

Los plásmidos abarcan una amplia variedad de géneros del dominio bacteria y al menos en términos de resistencia a antimicrobianos (RAM), llegan a tener mecanismos de resistencia similares, que sin estar necesariamente relacionados entre sí, pueden presentar el mismo gen RAM en distintas células bacterianas pero en lugares geográficamente no relacionados, gracias a un mecanismo de conjugación (Woodford et al., 2011). Dicha conjugación se da gracias al factor F o de "fertilidad" que es requerido para la transferencia de DNA a otras células receptoras, donde a través de un pili sexual bacteriano los plásmidos son transferidos de manera inespecífica (Hayes 1952; Hayes 1953; Lederberg and Tatum 1946b; Lederberg and Tatum 1946a; Lederberg et al. 1952). Este pili además puede retraerse gracias a la despolimerización de la célula receptora, con el fin de establecer un "contacto íntimo celular" pared a pared y mantener estable la unión de ambas células (Curtiss III 1969; Marvin and Hohn 1969; Achtman et al. 1978; Achtman et al. 1977). Este proceso está determinado por genes localizados en regiones gnómicas *tra* del plásmido donador que determinan los sistemas de transferencia plasmídica y que permiten la clasificación en distintas familias de secreción.

Estas moléculas de DNA también pueden ser transferidos artificialmente por transformación bacteriana en condiciones controladas y son llamados vectores moleculares, un avance biotecnológico que ha sido útil en investigaciones y aplicaciones industriales, agrícolas y médicas (Tolmasky and Alonso, 2015).

1.2.2. *Replicación plasmídica*

Como se mencionó anteriormente la replicación plasmídica es autónoma, sin embargo hacen uso de proteínas codificadas por el cromosoma de la célula huésped, lo que significa que dicho proceso sea crítico para la supervivencia de los plásmidos como un material genético extracelular (Tolmasky and Alonso, 2015). El proceso sucede cuando la proteína iniciadora se une a los sitios de unión específicos del origen de replicación del DNA plasmídico, promoviendo que una parte pequeña de este se desenrolle, dando paso a la helicasa y finalmente dando inicio a la síntesis del DNA (Bramhill and Kornberg, 1988). La replicación también se presenta cuando la célula huésped comienza su proceso de división celular, esto con el fin de aumentar el número de copias del o los plásmidos para que sean heredados a las células hijas; este sistema de partición estable se clasifica basado en proteínas ATPasas involucradas en el proceso (Gerdes et al., 2000). En algunos casos, ciertas proteínas de tipo ATPasas unen los plásmidos y las regiones de origen replicativo de los cromosomas a los polos específicos de la división celular (Gerdes et al., 2000). En otros casos, proteínas codificadas de genes como *sopA* y *sopB* (Ogura and Hi-

raga 1983; Ah-Seng et al. 2009) o *parA* y *parB* (Abeles et al., 1984) participan en esa unión. En conclusión la estabilidad "mitótica" de los plásmidos depende en gran medida de un centrómero, una proteína de unión al centrómero y una ATPasa (Tolmasky and Alonso, 2015). No obstante, algunos tipos de plásmidos no requieren un sistema de partición estrictamente establecido para que la replicación sea predicha; es el caso de aquellos plásmidos en el que la replicación permite un alto número de copias, estos, poseen un sistema de partición aleatorio que asegura la segregación de las copias de DNA a las células hijas en un número proporcional al que tenía la célula origen (Summers and Sherratt, 1984). Otro tipo de plásmidos generalmente grandes, en los que su sistema de replicación permite solo un bajo número de copias, poseen enzimas de inhibición del crecimiento celular codificadas por genes acoplados a la división de la célula huésped, de manera que cuando esta haya perdido su plásmido (por errores durante la replicación o división), comienza una cascada enzimática gracias a la inestabilidad de la proteína plasmídica que evita la activación de dichas enzimas inhibitorias. Inevitablemente, este sistema lleva a la muerte específica de células que no poseen plásmidos (Jaffe et al. 1985; Tolmasky and Alonso 2015).

1.2.3. Plásmidos asociados a resistencia antimicrobiana y virulencia en cepas de *Providencia rettgeri*

Los plásmidos pequeños reportados en bacterias Gram negativas a menudo no están asociados a la transferencia de resistencia antimicrobiana debido a que los genes asociados se encuentran localizados fuera de los cassettes de resistencia y/o de elementos móviles dentro del vector como los transposones, o no poseen un origen de transferencia (*OriT*) para estos genes, y si lo tiene esta más bien asociado a otras funciones de conjugación haciendo que la diseminación de estos vectores sea menos eficiente (Francia et al., 2004).

Plásmidos como pJHCMW1 de *Klebsiella pneumoniae* que se encuentra reportado en el grupo de plásmidos pequeños entre 2Kpb y 25Kpb para esta especie (Tolmasky and Alonso, 2015), no son autotransferibles y poseen un mecanismo de replicación de tipo ColE1 y un *OriT* acompañado de genes que codifican para un complejo restante del relaxosoma (Smillie et al., 2010), haciendo menos eficiente la autotransferencia. No obstante la estructura mencionada se encuentra generalizada en otros plásmidos relacionados con otras Enterobacterias (Tolmasky and Alonso, 2015), como en el plásmido pFPTB1 de *Salmonella enterica* serovar Tiphymurium, el cual comparte genes de resistencia como *bla*_{TEM-135} pero difiere en la localización de *OriT* y la eficiencia del sitio de recombinación sitio-específica Xer la cual asegura la herencia del plásmido (Tran et al. 2010; Pasquali et al. 2005).

En el caso específico de *Providencia rettgeri* se han reportado plásmidos pequeños entre 2.6Kpb y 5.5Kpb, de los cuales dos pDIJ09-518a y pGHS09-09a no conjugativos de 2.683Kpb poseen cuatro marcos de lectura abiertos putativos (*ORFs*) y un gen *qnrD*, el cual solo se había reportado en aislados de *Salmonella* (Cavaco et al., 2009) y *Escherichia coli* (Zhao et al., 2010). De hecho, sugieren que dichos plásmidos podrían haberse originado de una misma cepa parental o que ambas cepas compartieron algunos eventos genéticos pero que no fueron de alguna manera transferidos entre sí sin ayuda de al menos otro plásmido conjugativo (Guillard et al., 2012), como ya se ha especulado en otros casos (Tolmasky and Alonso, 2015). De igual forma, otra hipótesis plantea que *qnrD* está más estrechamente relacionado con *Proteus spp.* y *Providencia spp.* que otros genes y que posiblemente dicho gen haya sido originado en una de estas especies, ya que ambos plásmidos pDIJ09-518a y pGHS09-09a comparten secuencias con genomas de especies de *Proteus* teniendo una alta homología; similar a pPRTE1 de *P. rettgeri* (Galac and Lazzaro, 2012). Además ambos plásmidos no tienen ninguna estructura de movilización y comparten porcentajes de GC similares a *qnrD* y a los cromosomas de ambos géneros: pDIJ09-518a 41.89%, pGHS09-09a 41.74% *qnrD* 38% - *Proteus* 38-39%, *Providencia* 38-40%, a diferencia de *Salmonella* cuyo porcentaje de GC es de 48%; por no mencionar que ambos plásmidos tienen una secuencia de replicón de tipo theta corriente arriba de *Orf4* que codifica a una proteína Rep aparentemente sin ninguna similitud con otras Rep (Guillard et al., 2012).

Por otra parte, los plásmidos grandes generalmente >50Kpb si se encuentran altamente relacionados con la transferencia de genes de resistencia y virulencia, y pertenecen a distintas familias de incompatibilidad. El interés de estudiar estas moléculas ha venido incrementándose ya que se han visto relacionadas a la multirresistencia en especies como *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. coli* y *P. rettgeri* entre otras; donde a menudo se encuentran plásmidos que albergan *bla_{KPC}*, *bla_{NDM-1}* y *bla_{OXA}* (Patel and Bonomo 2013; Nordmann et al. 2011a) y eventualmente son reportados como megaplásmidos. A diferencia de los plásmidos pequeños, la estructura de estos plásmidos si poseen una maquinaria de conjugación que les permite auto-transferirse, esta maquinaria tiene genes que codifican para el relaxosoma, para una proteína de acoplamiento tipo IV y para un sistema de secreción tipo IV (Guglielmini et al., 2012). Así mismo, los genes de resistencia pueden ir acompañados de genes de virulencia de manera tal que pueden coexistir en una misma molécula de DNA plasmídica (Tolmasky and Alonso, 2015).

De los genes que han generado más interés en la última década a nivel de salud pública ha sido *bla_{NDM-1}*, que originalmente fue encontrado en un plásmido de *K. pneumoniae* y fue diseminándose entre otras especies bacterianas y actualmente está presente en casi todas las especies de Enterobacterias (Yong et al. 2009; Nordmann et al. 2011b). Esta carbapenemasa solo ha sido relacionada a plásmidos conjugativos que pertenecen a distintas familias de

incompatibilidad (Tolmasky and Alonso, 2015), pero especialmente relacionada con IncA/C2 (Marquez-Ortiz et al., 2017a).

Particularmente, algunos plásmidos denominados como bla_{NDM-1} positivos reportados en *P. rettgeri* se han visto relacionados a plásmidos de tipo IncA/C2 de *K.pneumoniae* (p6234-178kb) y *A. baumannii* (pNDM-BJ01) sorprendentemente sin la región conservada propia de este tipo de plásmidos como el gen *repA*. Sin embargo plásmidos como pRB151-NDM de 108Kpb y p06-1619-NDM de 90Kpb, sí. Dicha secuencia se encuentra flanqueada por un elemento móvil putativo, al menos en P06-1619-NDM (Marquez-Ortiz et al., 2017a) (Figura 1.1).

pRB151-NDM no se encuentra estrechamente relacionado con ninguno de los plásmidos reportados en Enterobacterias, no obstante es un plásmido bla_{NDM-1} positivo que también contiene una región de genes codificantes de virulencia. Por su parte, p06-1619-NDM si posee una estructura muy similar al plásmido pNDM-BJ01 y un elemento móvil nuevo que le confiere genes del sistema toxina-antitoxina como *parED* y *relEB* (Marquez-Ortiz et al., 2017a) (Figura 1.1).

Asimismo, el plásmido más grande reportado de *P. rettgeri* p16Pre36-NDM de 224Kpb (Figura 1.1) se ha visto relacionado con el plásmido bla_{NDM-1} positivo pPrY2001 de una cepa de *P. rettgeri* reportada en Canadá (Mataseje et al., 2013), el cual comparte regiones putativas asociadas con la transferencia conjugativa; también posee otra región asociada a la transferencia como Tra 1 (Marquez-Ortiz et al., 2017a), genes *dfrA1-aadA1-qacEΔ-sul1*, *aph(3')-la*, *sul2* y *tet(B)* asociados a la resistencia de compuestos amino cuaternarios, aminoglucósidos, sulfonamidas y trimetropim; y genes accesorios *tat-dct-groES-groEL-ISCR21-Δpac* (Marquez-Ortiz et al., 2017a).

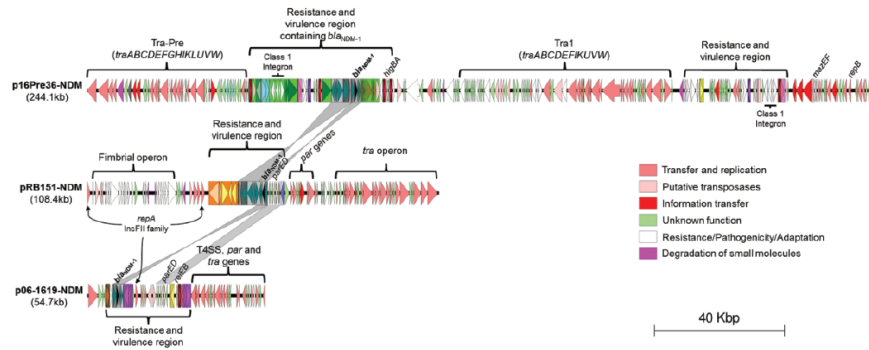


Figura 1.1: Organización de plásmidos NDM-1 positivos de *P. rettgeri*
Tomado de (Marquez-Ortiz et al., 2017a)

Finalmente el plásmido pPrY2001 reportado en Canadá por (Mataseje et al., 2013) de 113Kpb, tiene un perfil de genes de resistencia a β -lactámicos,

carbapenemasas, aminoglucósidos, ciprofloxacina y trimetoprim sulfametoxazol. Este plásmido fue uno de los primeros NDM-positivos reportados en *P. rettgeri* con un perfil multirresistente que no tenía una homología significativa con otras estructuras plasmídicas reportadas hasta ese momento. pPrY2001 es un plásmido con sistema toxina- antitoxina de tipo II asociado a efectos bacteriostáticos y contiene un gen *repA* truncado por una secuencia de inserción IS 903, un "nuevo" gen *repB*, una región de transferencia de tipo tra y un gen *bla*_{NDM-1} flanqueado por dos IS26.

1.2.4. *Transposones y Secuencias de inserción*

Los transposones son pequeñas secuencias de DNA que generalmente se localizan en el cromosoma bacteriano, pero también pueden encontrarse en plásmidos. Habitualmente son llamados "genes saltarines" y son parecidas a otras secuencias como profagos y episomas (plásmidos asociados a cromosomas), aunque su mecanismo de escisión del cromosoma es diferente. Estas secuencias se hallan flanqueadas entre dos fragmentos de inserción idénticos o palíndricos, que codifican precisamente una enzima llamada transposasa. Estos elementos no se "movilizan" *per se*, es decir, en algunos casos son sus copias las que pueden localizarse en otras regiones genéticas, ya sea dentro del cromosoma o dentro de un plásmido y en otros casos, la enzima transposasa regula el corte y la inserción dentro de una región al azar (Curtis and Schnek, 2008).

Como se mencionó anteriormente, estas secuencias tienen la capacidad de inactivar o promover la expresión genética, mutando la secuencia dependiendo de la región en la que se inserten, este comportamiento también se relaciona con el *switch* genético. Algunas secuencias de transposones sólo cuentan con la maquinaria para trasladarse, otras por su parte, son más complejas y llevan otros genes dentro de sí mismas, promoviendo la expresión de estos en cualquier región genómica en la que se encuentren; este tipo de transposones se les conoce como compuestos y pueden saltar fácilmente entre plásmidos o entre cromosomas a plásmidos y generalmente están asociados a la transferencia de genes resistentes a antimicrobianos (Curtis and Schnek, 2008).

De hecho, el plásmido p16Pre36-NDM de *P. rettgeri* mencionado anteriormente, lleva un complejo de transposón compuesto que contiene una secuencia de inserción (IS26) que flanquea corriente arriba y corriente abajo una variante de transposón $\Delta Tn21$ y que a su vez lleva "remanentes" de otro transposón *Tn125* donde se encuentra el gen *bla*_{NDM-1} y los genes accesorios ya mencionados en la sección anterior; además lleva un operón *mer* aunque separado de esta organización de transposón (Figura 1.2). Particularmente el típico transposón *Tn21* se encuentra en secuencias de inserción de tipo IS1353 e IS1326, en operones *mer* y en integrones de clase 1, y están asociados a la diseminación de la resistencia a antimicrobianos (Liebert et al.,

1999), lo que sugiere que este plásmido lleva determinantes multiresistentes (Marquez-Ortiz et al., 2017a).

Otro plásmido de interés pRB151-NDM de *P. rettgeri*, solo tiene ese gen de resistencia, también posee una variante de transposón $\Delta Tn125$ que contiene el gen y otro transposón corriente abajo Tn6369; por su parte corriente arriba se encuentra una secuencia putativa de elementos genéticos móviles: resolvasa, la cual codifica a una enzima del mismo nombre y está involucrada en la integración del transposón al DNA plasmídico, más un sistema toxina-antitoxina (Marquez-Ortiz et al., 2017a) (Figura 1.2).

Por su parte p06-1609-NDM de *P. rettgeri*, contiene dos secuencias de transposón Tn6368 el cual abarca el gen de resistencia *bla_{NDM-1}*, además flanquean un elemento genético móvil putativo. A parte, existe una deleción de los genes *parB* y *virB5* implicados en la formación de sistemas de partición (Marquez-Ortiz et al., 2017a) (Figura 1.2). Se cree que este podría transferirse con ayuda de un plásmido similar encontrado en la misma cepa, que si lleva una maquinaria de conjugación putativa de *P. rettgeri* llamada Tra-pe (Marquez-Ortiz et al., 2017a) y que ha sido reportada en otros plásmidos asociados a resistencia antimicrobiana (Dery et al., 1997).

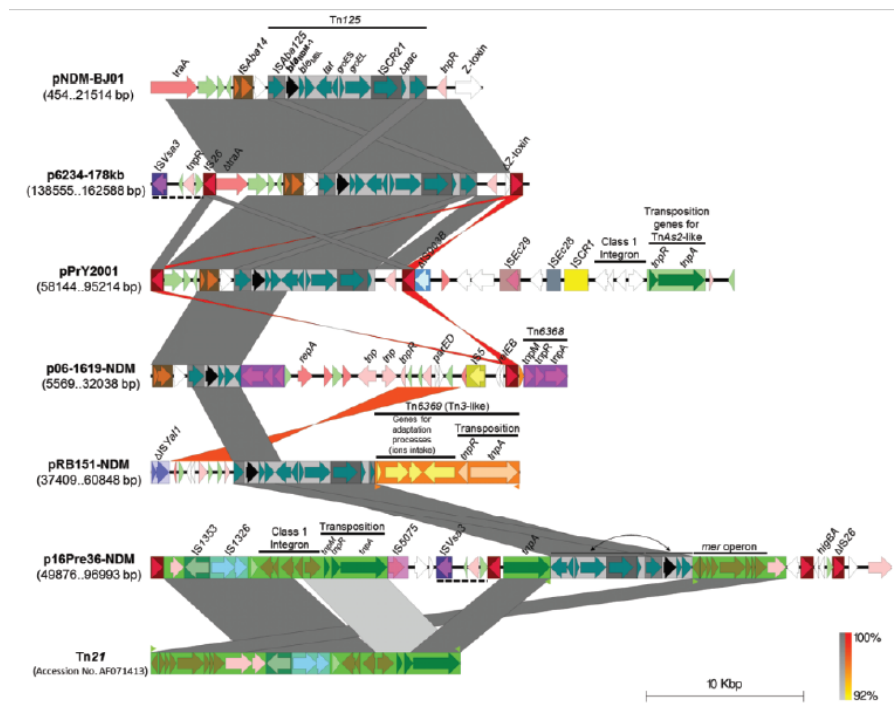


Figura 1.2: Transposones y secuencias de inserción reportadas en plásmidos de *P. rettgeri*. Tomado de (Marquez-Ortiz et al., 2017a)

Por último, como se mencionó anteriormente el plásmido pPrY2001 posee una secuencia de inserción IS26 la cual se sabe que está ampliamente compartida entre la mayoría de Enterobacterias y que se encuentra asociada a la resistencia a β -lactámicos; corriente abajo se encuentra una fosfotransferasa, una proteína de eflujo específica para macrólidos, una transposasa ISEc29 y una IS903 la cual podría tener un cassette *aac (6)-Ib* (Figura 1.2). De igual forma, este plásmido alberga el gen *bla*_{NDM-1} en una copia de ISAb125 el cual es compartida con cepas de *A. baumannii* a excepción que esta última tiene dos copias de dicha secuencia de inserción, también se observa en cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Citrobacter. spp* (Mataseje et al., 2013).

1.3. Plasticidad plasmídica de *Providencia rettgeri*

Para el año 2011, Shaare - Zedek Centro Médico Israelí, reportó un aislamiento clínico de *P. rettgeri* con un fenotipo resistente a carbapenémicos, gracias a la expresión de una β -lactamasa de tipo NDM-1 extendida en el hospital, presuntamente por la transferencia de elementos genéticos móviles de una bacteria ambiental de poca importancia clínica (Nordmann et al., 2011c). Para ese año nunca se había reportado un fenotipo igual en esta bacteria (Lachish et al., 2012); esta cepa fue denominada como *Providencia rettgeri* H1736 (Olaitan et al., 2015).

H1736 fue secuenciada por primera vez en el año 2015, presentando un tamaño de 4.609.352pb, además fueron descritos cinco diferentes plásmidos presentes en esta cepa (Olaitan et al., 2015).

El perfil de resistencia de la cepa abarca 27 distintos antibióticos incluidos: aminoglucósidos, β -lactámicos, quinolonas, fluoroquinolonas, macrólidos y sulfonamidas entre otros. La mayoría de los genes de resistencia a estos antibióticos están codificados en plásmidos y en elementos conjugativos integradores, tres de ellos asociados al cromosoma. Adicionalmente hay 33 elementos de regulación génica y 47 regiones de plasticidad genómica que contienen un grupo de genes *aga* (genes que codifican para proteínas críticas en el proceso de virulencia), genes de resistencia antimicrobiana y un operón con 9 genes *cmpA* y *cmpH* que codifican para carbapenemasas. Estas regiones de plasticidad comprenden el 19% del genoma completo (Olaitan et al., 2015).

Todas estas características genómicas contenidas en *P. rettgeri* H1736, le confieren una colección de elementos genéticos flexibles que fueron transferidos horizontalmente, confirmando que estos elementos genéticos móviles están estrechamente relacionados con la resistencia a carbapenémicos puesto que tienen integrado un gen *bla*_{NDM-1} (Olaitan et al., 2015). Pese a esto, también se han relacionado otros plásmidos que juegan un rol "auxiliar" que podría ayudar a la movilización de los plásmidos transportadores de NDM-1, de los que aún no se tiene mucha información (Barrios et al., 2013).

Enzimas reportadas	Genes	Clase de antibiótico	Ubicación	Referencia
NDM-1	<i>bla_{NDM-1}</i>	β -lactámico	Plásmido	(Lachish et al., 2012)
IMP	<i>bla_{IMP}</i>	β -lactámico	Plásmido	(Barrios et al., 2013)
TEM-2	<i>bla_{TEM-2}</i>	β -lactámico	Plásmido	(Mahrouki et al., 2015)
TEM-24	<i>bla_{TEM-24}</i>	β -lactámico	Plásmido	"
PER-1	<i>bla_{PER-1}</i>	β -lactámico	Plásmido	(Shin et al., 2018)
OXA-48	<i>bla_{OXA-48}</i>	β -lactámico	Plásmido	(Otlu et al., 2018)
OXA-72	<i>bla_{OXA-72}</i>	β -lactámico	Plásmido	(Tada et al., 2014)
Macrólido 2'- Fosfotransferasa	<i>mph</i>	Macrólido	Plásmido	"
Dihidropteroato -Sintetasa Tipo I	<i>sulI</i>	Sulfonamida	Plásmido	"
Dihidrofolato reductasa Tipo I	<i>dhfrfAI</i>	Trimetoprim	Plásmido	"

Tabla 1.1: Mecanismos de resistencia enzimática asociados a plásmidos reportados en *P. rettgeri*

Posteriormente se realizó una secuenciación de genoma completo de una cepa colombiana de *P. rettgeri* RB151, aislada en Bucaramanga. Este estudio demostró la presencia de un cromosoma de 4.8 Mpb y un megaplásmido

de 108 Kpb NDM-1 positivo, responsable del comportamiento fenotípico de la bacteria. Además se reportó la presencia de elementos conjugativos integradores asociados al cromosoma similares a otros aislamientos en Bogotá (Marquez-Ortiz et al., 2017b).

Otros genes asociados a resistencia en *P. rettgeri* son: *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{OXA-72} y *bla*_{IMP}. Los tres primeros fueron reportados en aislados clínicos de *P. rettgeri* de 2008 en Nigeria; 2012 en Nepal y 2017 en Turquía respectivamente (Aibinu et al. 2011; Tada et al. 2014; Otlu et al. 2018). El último fue repostado en 2017 en un aislado clínico de México (Bocanegra-Ibarias et al., 2017) (Tabla 1.1). Todos, menos *bla*_{OXA-10}, están asociados a plásmidos.

Los reportes anteriormente mencionados varían de acuerdo a los tamaños plasmídicos encontrados en distintas cepas de *P. rettgeri* multirresistentes en un rango relativamente alto que va desde 108Kpb hasta los 130Kpb y 150Kpb. Esta variedad de tamaños se debe a que los plásmidos están en continuo rearrreglo y podrían estar asociados entre si (Aschbacher et al., 2008).

1.4. Epidemiología de *Providencia rettgeri*

Gracias al comportamiento de diseminación de las Enterobacterias en general, no tardó mucho en presentarse los primeros casos de cepas portadoras del gen *bla*_{NDM-1} en América Latina y el primero en reportar la primera cepa de *P. rettgeri* NDM-1 positivo fue el hospital universitario de Monterrey México en Enero de 2012 (Barrios et al., 2013). Así, como en un efecto domino, fueron reportándose casos en Brasil, Argentina, Ecuador y Colombia (Carmo Junior et al. 2015; Pasteran et al. 2014; Zurita et al. 2015; Marquez-Ortiz et al. 2017b).

Para el año 2017 un grupo de veintiún aislados clínicos provenientes de México y Colombia, conformados por *Providencia rettgeri*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* que expresaban el gen *bla*_{NDM-1} fueron secuenciados por tecnología Illumina solexa y Pacific Biosciences, ensamblados y finalmente caracterizados (Marquez-Ortiz et al., 2017a). Este estudio describió una posible diseminación de los plásmidos que contienen dicho gen; explica además como desde una cepa de *Acinetobacter.spp*, el plásmido NDM-BJ01, se propagó al rededor del mundo y a partir de variaciones genéticas fue transferido a distintas especies de Enterobacterias (Toleman et al., 2012). Hoy día, estos plásmidos que están presentes en distintas especies de la familia *Enterobacteriaceae* no se encuentran ya directamente relacionadas con este antecesor. Estos cambios genéticos están estrechamente relacionados con presiones de selección en el medio ambiente y han generado en una continua evolución de variabilidad genética, dentro de un set de elementos móviles que les han permitido pasar entre distintos géneros y especies bacterianas.

Prueba de lo anterior, es la identificación de una segunda especie de Enterobacterias que hospedan un plásmido similar a NDM-BJ01 en una cepa clínica aislada en Monterrey, México (Barrios et al., 2013), además de otros tres plásmidos aislados en *P. rettgeri* de muestras clínicas colombianas que compartían características genéticas idénticas, que también se encuentran en la cepa H1736 aislada en Israel (Olaitan et al., 2015). De igual forma, pese a que los aislados mexicanos y colombianos compartían ciertas regiones, los aislados colombianos, se asociaron más bien con plásmidos encontrados en cepas de *K. pneumoniae*, mientras que los aislados mexicanos mostraron relación con plásmidos de cepas de *Acinetobacter spp* (Marquez-Ortiz et al., 2017a).

Los resultados reportados en la última década, coinciden con la aparición de una cepa de *P. rettgeri* multirresistente en distintas partes de mundo, asociadas a elementos genéticos móviles (EGM) que les permite diseminarse, llevando otros elementos integrados que aportan a la vulnerabilidad genómica de cada EGM.

1.5. Detección y caracterización de plásmidos a partir de secuenciación de genoma completo y el uso de herramientas bioinformáticas

El impulso de tecnologías de secuenciación ha permitido el estudio y el análisis genómico de distintas especies naturales como animales, plantas, hongos, bacterias y protozoos, que han aportado al conocimiento de la diversidad biológica como la filogenia, la epidemiología genética, la cuantificación del flujo de información genética y la predicción de estructuras espaciales de proteínas entre otros (Bossart and Prowell, 1998). De igual forma el desarrollo de tecnologías de secuenciación masiva o de nueva generación, ha supuesto en los últimos años el perfeccionamiento de los procesos analíticos, haciéndolos en menor tiempo y a bajo costo, gracias al hecho de obtener grandes cantidades de material genético organizados en librerías para la disposición de los mismos (Schloss, 2008). La determinación de polimorfismos y mutaciones puntuales son otras de las ventajas que presentan estas tecnologías, pero el volumen de información crea un gran desafío para el desarrollo de programas informáticos que permitan el almacenamiento basto de la misma, la organización, el curado, la interpretación, el análisis y la separación, para que la información que se deriva pueda ser útil (López De Heredia Larrea 2016; Jolley et al. 2018).

Actualmente el estudio de DNA plasmídico de procariotas a partir de secuenciación de genoma completo ha venido en aumento y han aportado al entendimiento del entorno genético de distintas especies bacterianas, así como el comportamiento y evolución de estas. Dicho comportamiento evolutivo, se ha relacionado particularmente a la adquisición de estructuras genéticas que



Figura 1.3: Tecnologías de secuenciación masiva
Tomado y modificado de (López De Heredia Larrea, 2016)

les ha permitido la obtención de elementos genéticos, confiriéndoles ventajas adaptativas.

En *Providencia rettgeri* se han reportado once plásmidos de distintos tamaños a partir del uso de tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. A continuación se relacionan estos once plásmidos reportados en la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) hasta el 20 de Mayo de 2019, última fecha de consulta.

Nombre Del plásmido	ID secuencia	Tamaño	Genes	NGS
R7K	NC_010643.1	37.792Kb	43	-
pPRET1	NZ_CM001856.1	5.567Kb	7	FLX 454
pPrY2001	NC_022589.1	113.295Kb	95	FLX 454
pPDIJ09-518a	NC_025043.1	2.683Kb	4	-
pGHS09-09a	NC_025044.1	2.683Kb	4	-
pRB151-NDM	NZ_CP017672.1	108.417Kb	118	PacBio RSII
AR_0082	NZ_CP029737.1	144.970Kb	186	PacBio RSII
p16Pre36-NDM	KX832927	244.116pb	237	PacBio RSII
p16Pre36-2	KX832926.1	43.191pb	56	PacBio RSII
p06-1619NDM	KX832928	54.712pb	62	PacBio RSII
p06-1619-2	KX832929	90.666pb	-	PacBio RSII

Tabla 1.2: Plásmidos reportados de *Providencia rettgeri* en bases de datos primarias y secundarias

Por otra parte, el desarrollo de métodos bioinformáticos que permiten detectar y clasificar secuencias plasmídicas y secuencias cromosomales a partir de un conglomerado de *contigs* o *reads* secuenciados del genoma completo, también permiten caracterizarlos ya que en su mayoría están asociados a bases de datos específicas para resistencia antimicrobiana, virulencia, metabolismo, replicones y/o proteínas específicas como PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014), PLACNET (Vielva et al., 2017) y PlasFlow (Krawczyk et al., 2018). Otras como PlasCope permiten la personalización de la base de datos

para estudios más específicos, sobre todo si el objetivo es la identificación de caracteres propios de una especie (Royer et al., 2018). En general estas herramientas llegan a basarse en características gnómicas propias de este tipo de moléculas y no de otras sin embargo, difieren en gran medida en sus valores de precisión y *recall* debido a metodología empleada. Otras herramientas recientemente desarrolladas son plasmidSPAdes (Antipov et al., 2016), Recycler (Rozov et al., 2017) y cBar (Zhou and Xu, 2010).

En resumen la importancia de estos elementos genéticos móviles como estructuras que confieren ventajas evolutivas y adaptativas a partir de la producción de bactericidas, enterotoxinas, enzimas de modificación y/o restricción y factores relevantes para la virulencia, entre otros, hace que el estudio de este tipo de moléculas sea cada vez más relevante, sobre todo por la evidente relación que existe con la transferencia horizontal de genes asociada a la resistencia a antimicrobianos que se comparten entre distintas especies bacterianas, gracias a su mecanismo de conjugación.

Asimismo, el ambiente genómico cambiante de los plásmidos conjugativos relacionados con la transferencia horizontal de genes resistentes a antimicrobianos (RAM), despierta un especial interés, debido al incremento de especies bacterianas multirresistentes y que, particularmente en *P. rettgeri* son relativamente "nuevas". Genes como *bla_{OXA}*, *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}* son reportados con más frecuencias en esta especie e incluso ya cuentan con plásmidos NDM caracterizados donde varios de ellos llevan complejos de transposones compuestos, variantes de estos o remanentes de otros que fueron adquiridos a lo largo de varios eventos conjugativos, así como también integrones asociados a la diseminación de la resistencia llevando determinantes multirresistentes, a menudo en una sola célula bacteriana.

Puntualmente en Colombia se han reportado cinco plásmidos >40Kpb en *P. rettgeri* (Marquez-Ortiz et al., 2017a), de los cuales cuatro poseían genes de resistencia a β -lactámicos, acompañados por otros genes RAM. Estos pertenecen a cepas que se obtuvieron en un periodo de tiempo de dos años (2012-2014) provenientes de Bogotá, Bucaramanga y Monterrey (México). Así, aunque su variabilidad genómica es amplia, como ya se mencionó anteriormente, debido también a la presión de selección del medio ambiente, se describió una relación más estrecha de los plásmidos de cepas colombianas de *P. rettgeri* con otros reportados en cepas multirresistentes de *K. pneumoniae*.

El presente trabajo caracterizó los perfiles de elementos genéticos plasmídicos de 28 aislamientos colombianos de *P. rettgeri* causantes de IAAS, a partir de los datos de secuenciación de genoma completo (Illumina HiSeq 2500) así, se usó un *pipeline* que permitió la segregación de secuencias asociadas a plásmidos, aplicando diferentes enfoques de clasificación. Se evaluaron los elementos plasmídicos asociados a la resistencia y se hizo una comparación de los mismos, esto con el fin de contribuir al entendimiento de cómo se mantiene la variabilidad genómica de estas moléculas en cepas multirresistentes de *P. rettgeri*, como adquiere o cambia estos elementos y como aumenta o disminuye la resistencia frente a los antibióticos.

Por lo anterior se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles son elementos genéticos plasmídicos asociados a la resistencia a antibióticos presentes en 28 aislamientos colombianos de *Providencia rettgeri* obtenidos en el Instituto Nacional de Salud durante el periodo 2015-2016?

Para contestar esta pregunta se propuso el siguiente objetivo general:

Caracterizar los perfiles genéticos plasmídicos de resistencia antibióticos presente en aislamientos colombianos de *Providencia rettgeri*, obtenidos en el Instituto Nacional de Salud (INS) durante el periodo 2015-2016.

Tres objetivos específicos:

- I) Identificar la presencia de plásmidos en aislamientos de *P. rettgeri*.
- II) Determinar las características genéticas de los *contigs* asociadas a la resistencia en *P. rettgeri*.
- III) Determinar la relaciones genéticas entre los perfiles plasmídicos obtenidos y los de otras cepas de *P. rettgeri* previamente reportadas. Estos se desarrollaran en los siguientes capítulos.

Capítulo 2

Identificación de la presencia de plásmidos en aislamientos de *P. rettgeri*

2.1. Introducción

En la naturaleza la obtención de ventajas evolutivas que permiten la supervivencia a determinadas condiciones ambientales en especies procariontas, se ve afectada por su capacidad receptiva frente a secuencias genómicas foráneas que tienen la habilidad de transferir esta información a otras células de su misma especie o entre distintos géneros de un mismo reino y se denomina Transferencia Horizontal de Genes. Ambos escenarios se presentan gracias a elementos genéticos móviles (EGM's) como: Plásmidos, Elementos Conjugativos Integradores (ECI), islas gnómicas e integrones, que llevan genes que codifican proteínas de funciones especializadas y en el mejor de los casos, da como resultado una expresión fenotípica específica (Syvanen and Kado, 2001).

Actualmente, muchas de las características fenotípicas están dirigidas a la expresión de mecanismos de resistencia antimicrobiana, difundidas entre bacterias de distintos géneros. Esto implica un índice elevado de infecciones que causan morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos y crónicos, a menudo en ambientes hospitalarios. Cabe señalar, que la obtención de estas características evolutivas son también transferidas de manera vertical, es decir: de célula madre a célula hija, donde la célula hija y subsecuentes son llamadas clones (Woodford et al., 2011).

Muchos de los genes de resistencia a antimicrobianos (RAM) se encuentran en clones multirresistentes diseminados a nivel global y pueden o no ser expresados. Estos clones pueden tener varios alelos de una misma secuencia que son adquiridos independientemente y pueden evidenciarse a través de técnicas moleculares que discriminan distintos tipos de secuenciotipos en una sola cepa bacteriana, lo que sugiere una captación de DNA no propio y a su vez, una colección de genes de distinto ancestro en común. Esto es particularmente importante en estudios de epidemiología genética para saber,

por ejemplo, el tipo de bacteria causante de la infección, conocer su perfil de resistencia y los probables orígenes de la misma (Woodford et al., 2011).

Dada la importancia de la identificación de la presencia de plásmidos en aislamientos bacterianos de interés clínico, el presente estudio se planteó el siguiente objetivo: Identificar la presencia de plásmidos en aislamientos de *Providencia rettgeri* obtenidos por INS durante el periodo 2015-2016, con el fin de determinar la presencia de plásmidos en los aislamientos de estudio.

2.2. Metodología

2.2.1. *Material Biológico*

Los aislamientos bacterianos utilizados en este estudio fueron seleccionados del cepario de Microbiología del Instituto Nacional de Salud (INS) y obtenidos por el programa de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en IAAS durante el periodo 2015-2016. Estos fueron aislados de muestras de orina, hemocultivos, abscesos de piel y tejido muscular procedentes de clínicas y hospitales de Bogotá, Cundinamarca, Valle del Cauca, Sucre, Santander y Risaralda, cuyos detalles se pueden ver en la Tabla 2.1. Actualmente se encuentran en el cepario de los grupos de investigación de Epidemiología molecular y Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia- sede Bogotá. Estos aislamientos se incluyeron dentro del proyecto mediante el convenio de cooperación científica y técnica suscrito entre el INS y la Universidad Nacional de Colombia.

2.2.2. *Área de estudio*

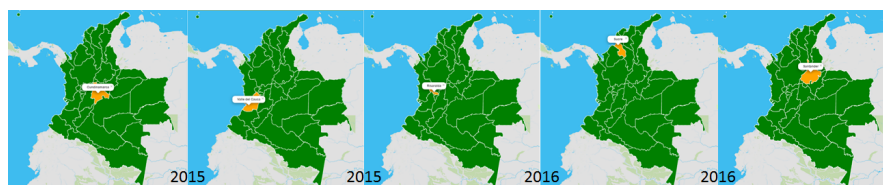


Figura 2.1: Área de estudio. 2015: Cundinamarca, Valle de Cauca y Risaralda. 2016: Risaralda, Sucre y Santander.

Registro Interno	año	Municipio	Sexo	Edad	Muestra	PRC NDM-1	PCR VIM
GMR-RA 14	2015	Bogotá	Masculino	30	orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 15	2015	Bogotá	Masculino	24	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 43	2015	Bogotá	Masculino	91	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 180	2015	Bogotá	Masculino	67	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 181	2015	Bogotá	Masculino	90	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 218	2015	Calí	Masculino	71	Secreción de pfe	Positivo	Negativo
GMR-RA 257	2015	Bogotá	Masculino	54	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 278	2015	Bogotá	Masculino	SD	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 437	2015	Bogotá	Masculino	21	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 454	2015	Zipaquirá	Masculino	56	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 555	2015	Bogotá	Masculino	31	Sangre	Positivo	Negativo
GMR-RA 649	2015	Bogotá	Masculino	90	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 767	2015	Pereira	Masculino	55	Hueso	Positivo	Negativo
GMR-RA 951	2015	Bogotá	Masculino	67	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 953	2015	Bogotá	Masculino	34	Tejido muscular	Positivo	Negativo
GMR-RA 1048	2015	Bogotá	Masculino	86	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 1080	2015	Bogotá	Masculino	89	Sangre	Positivo	Negativo
GMR-RA 1151	2015	Bogotá	Femenino	78	Orina	Negativo	Positivo
GMR-RA 1152	2015	Bogotá	Masculino	72	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 1153	2015	Bogotá	Masculino	74	Orina	Positivo	Positivo
GMR-RA 7716	2016	Bogotá	Masculino	39	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 13616	2016	Sincelejo	Masculino	23	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 22216	2016	Bogotá	Masculino	66	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 38516	2016	Bogotá	Masculino	83	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 42816	2016	Pereira	Masculino	68	Orina	Positivo	positivo
GMR-RA 43816	2016	Floridablanca	Masculino	26	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 44516	2016	Bogotá	Masculino	SD	Orina	Positivo	Negativo
GMR-RA 46616	2016	Pereira	Masculino	55	Orina	Positivo	Positivo

Tabla 2.1: Aislamientos de *Providencia rettgeri*: Comprenden un grupo de cepas causantes de IAAS, todos con un patrón multirresistente a antibióticos como imipenem, meropenem, ertapenem, cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y sulfonamidas-diaminopirimidinas.
* SD: Sin Dato

El material biológico trató de cubrir el mayor número de departamentos que reportaron aislamientos de *P. rettgeri* durante los años 2015 y 2016, de igual forma dichos aislamientos fueron seleccionados dadas sus características fenotípicas de multiresistencia y están representados en cinco departamentos de Colombia como se muestra en la Figura 2.1 y en la Tabla 2.1. Cabe mencionar que los datos sociodemográficos como el año, departamento, origen de la muestra, diagnóstico y edad del paciente fueron proporcionados por el INS.

2.2.3. Identificación de los aislamientos criopreservados

Para la identificación microbiológica se descongelaron conjuntos de 10 aislamientos por día y se inocularon en 15mL de caldo Luria Bertani (LB). En seguida se incubaron a $37^{\circ}C$ en agitación constante de 250rpm (revoluciones por minuto) durante 24 horas. A continuación se sembraron por método de aislamiento en agar MacConkey para la identificación de colonias aisladas no fermentadoras de lactosa y finalmente fueron pasadas en agar LEEDS, un medio que contiene fenilalanina que permite detectar géneros como *Providencia*, detectando enzimas catalíticas productoras de ácido fenilpirúvico mediante la reacción con los iones de citrato férrico del medio, optimizando el crecimiento de colonias pardas amarillentas.

2.2.4. Extracción de DNA Plasmídico

Los aislamientos de *P. rettgeri* criopreservados a $-20^{\circ}C$ fueron descongelados para inocular 100uL de cada uno en 15mL de caldo LB, estos se incubaron a $37^{\circ}C$ en agitación constante de 250 revoluciones por minuto (rpm) durante 24 horas. Posteriormente se realizó un siembra por técnica de aislamiento en agar LB y se dejó incubar a $37^{\circ}C$ durante 24 horas. Para cada uno de los aislamientos fue seleccionada una colonia pura para un nuevo subcultivo en caldo LB, en esta ocasión se dejó incubar a $37^{\circ}C$ en agitación constante de 300 rpm durante 12 horas hasta alcanzar una densidad óptica entre 2.0 y 3.0 (600nm). En seguida, se tomaron los 15mL de LB previamente inoculados y fueron vertidos en tubos Falcon para ser centrifugados a $5000 \times g$ por 10 minutos hasta formar un pellet celular que fue re suspendido en 500uL de RNasa A. A continuación se inició el proceso de extracción de acuerdo con el protocolo de centrifugación del E.N.Z.A.® Plasmid DNA Mini Kit II de la casa comercial OMEGA. La extracción fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% preparado con buffer TAE (Tris-Ácido acético-EDTA) al 1X más 2uL de Bromuro de Etidio. Cada muestra se preparó en una concentración de 10uL más 2uL de buffer carga y fueron corridos a 100V durante

1 hora y 20 minutos. El marcador de peso molecular utilizado fue una cepa conocida ATCC *Escherichia coli* V517, que alberga hasta 8 plásmidos de tamaños distintos. La determinación de las bandas del DNA plasmídico fue visualizada en un fotodocumentador (Molecular Imager® Gel Doc TM XR+ Imaging System-Bio-Rad) mediante el programa Image Lab 5.2.1. Finalmente para el análisis de bandeo de los productos de extracción se utilizaron los programas GelAnalyzer freeware v2010 ([http:// www.GelAnalyzer.com/](http://www.GelAnalyzer.com/)) y PyElph v1.4 (Pavel and Vasile, 2012).

2.2.5. *Cuantificación de DNA*

Para evaluar la concentración y calidad del DNA extraído se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop® ND-2000C de Thermo Scientific, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá (IBUN). La cuantificación fue realizada a 260nm en cada una de las muestras y la verificación de la calidad se midió en relación de absorbancia 260/280 (Anexo A).

2.3. Resultados y Discusión

2.3.1. *Área de estudio*

Los aislamientos de *Providencia rettgeri* fueron seleccionados por su perfil de resistencia siendo todos multirresistentes con una sensibilidad reducida a antibióticos carbapenémicos y representativos de los años 2015-2016, recolectados dentro del programa de vigilancia por el laboratorio de resistencia a los antimicrobianos en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) del INS, los cuales en su mayoría son del centro del país. Además contienen una característica genotípica principal identificando en cada una de ellas el gen *bla*_{NDM-1}. Así, Bogotá y Pereira fueron las ciudades con más número de aislamientos reportados con n=21 y n=3 muestras enviadas que representan el 75 % y el 10,7 % del total de aislamientos respectivamente, seguidos por Zipaquirá, Cali, Sincelejo y Floridablanca que reportaron n=1 muestras enviadas las cuales representan el 3,6 % cada una (Figura 2.2).

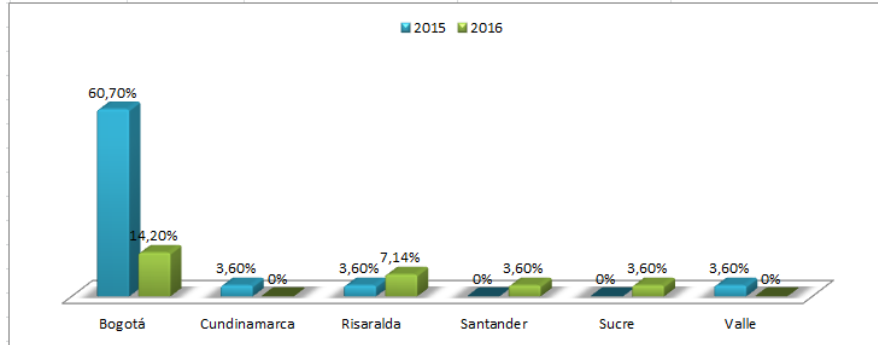


Figura 2.2: Aislamientos por año y departamento

Aunque el estudio trató de recolectar la mayor cantidad de aislamientos de manera que cubriera un amplio sector del país, los aislamientos obtenidos fueron 28. Además de que el número de aislamientos haya sido simplemente porque esos fueron los únicos reportes de aislados multirresistentes recolectados por el INS, también pudo deberse al hecho que *P. rettgeri* era hasta ese momento, una bacteria poco conocida por su resistencia a antibióticos de relevancia clínica como cefalosporinas de segunda y tercera generación, carbapenémicos entre otros y la prevalencia en el país era baja. Sin embargo, estudios ya comenzaban a reconocer cepas NDM-1 circulantes en Bogotá, Cali y Bucaramanga (Marquez-Ortiz et al., 2017a) dando cuenta de lo potencialmente peligrosa que se estaba convirtiendo esta bacteria. Por otra parte, la diferencia sobre el seguimiento y manejo epidemiológico de resistencia a antimicrobianos entre departamentos, pudo llevar a la variabilidad de aislados recolectados, lo que se ve reflejado en la diferencia aislados enviados por la capital del país y los demás departamentos.

2.3.2. Datos de las muestras

De acuerdo al origen de las muestras se relacionan en mayor medida a orina con un total de $n=23$ (82,1%), sangre $n=2$ (7,1%), hueso $n=1$ (3,6%), secreción de piel $n=1$ (3,6%) y tejido muscular $n=1$ (3,6%) datos representados en la Figura 2.3. Lo anterior concuerda con estudios que reportan infecciones graves por *P. rettgeri* en recintos hospitalarios causantes de sepsis (Sharma et al. 2017; O'Hara et al. 2000; Mahrouki et al. 2015) e infecciones en el tracto urinario (Sagar et al., 2017).

De igual forma es importante mencionar que 13 de los 23 aislamientos que tienen su origen en muestras de orina pertenecen a pacientes que fueron diagnosticados con cáncer, insuficiencias cardíacas, traumatismos e hipertensión, afecciones que en la mayoría de los casos requirieron hospitalización; o que

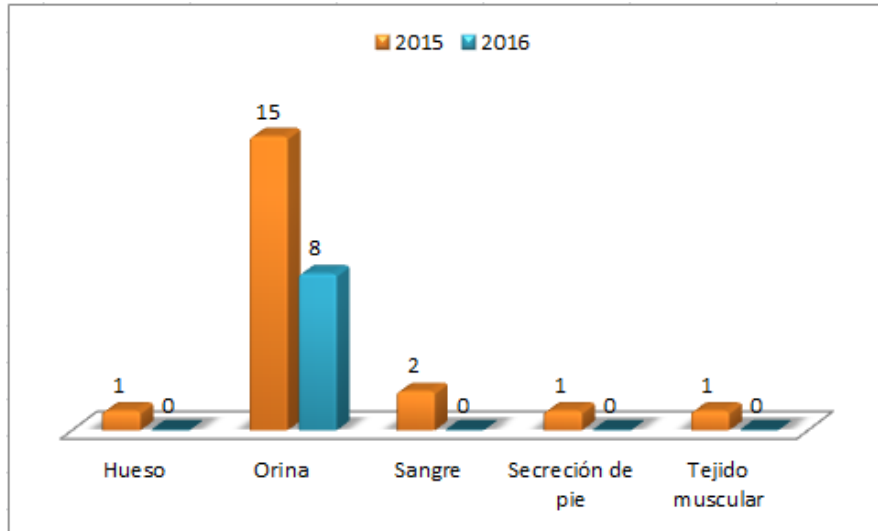


Figura 2.3: Aislamientos por origen de muestra

fueron diagnosticados con infección en vías urinarias después de haber sido sometidos a una intervención quirúrgica, estuvieran hospitalizados y/o estuvieran en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (Anexo B). Lo anterior es importante mencionar ya que representan el 56,5% del total de aislamientos de origen urinario que pueden reflejar directamente una infección asociada a la atención en salud (Figura 2.4).

Asimismo 10 de los 23 aislamientos de origen urinario pertenecen a un grupo de pacientes diagnosticados con infección en vías urinarias, de los cuales 2 fueron atendidos en los servicios de consulta externa y urgencias, 7 no tienen datos sobre el servicio de atención y 1 del cual no se tienen datos sobre servicio, edad o diagnóstico (Anexo B). Estos representan el 43,4% del total de los aislamientos de origen urinario, pero que igualmente fueron recolectados dentro del programa de vigilancia por el laboratorio de resistencia a los antimicrobianos en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) del INS (Figura 2.4).

Teniendo en cuenta que *P. rettgeri* es un patógeno generalmente asociado a infecciones en el tracto urinario (Sagar et al. 2017; Choi et al. 2015), este estudio no excepciona ese origen para la mayoría de los aislamientos objeto. Asimismo, la mayoría de estudios asocian este tipo de infecciones (por *P. rettgeri*), al uso prolongado de catéter uretral (Sagar et al. 2017; Choi et al. 2015), sin embargo en este estudio no se tiene el dato sobre si estos pacientes cumplían con esa categoría.

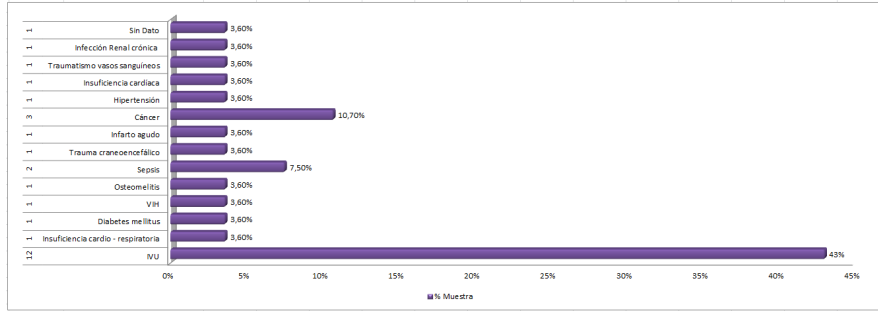


Figura 2.4: Aislamientos por diagnóstico

Finalmente los grupos etarios identificados en los 28 aislamientos clínicos fueron en su mayoría adulto mayor $n=14$ (50%), seguido por adulto joven $n=8$ (29%) y adulto $n=4$ (14%); solamente 2 de los 28 aislamientos no contaron con el dato de edad (7%) como se muestra en la figura 2.5. En general, las edades oscilan entre 21 y 91 años de edad de manera que no hay aislamientos procedentes de primera infancia (0-5 años de edad) aún cuando ya se han reportado casos graves de infecciones por *P. rettgeri* en recién nacidos (Sharma et al., 2017), infancia (6-11 años de edad) o adolescentes (12-19 años de edad). Estos datos refuerzan el hecho que la población más susceptible a contraer una IAAS es el adulto mayor, junto con la población de pacientes inmunocomprometidos que pudieran o no estar representados en este estudio por un grupo de 4 pacientes diagnosticados con cáncer y/o Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) que son el 14,2% (datos mostrados en el anexo B); sin embargo esto solo podría suponerse ya que no se tienen datos sobre la evolución o historia clínica de ninguno de los pacientes. Por último cabe señalar que 27 de los aislamientos fueron obtenidos de pacientes masculinos y solo 1 de un paciente femenino representando el 96,4% y el 3,57% respectivamente.

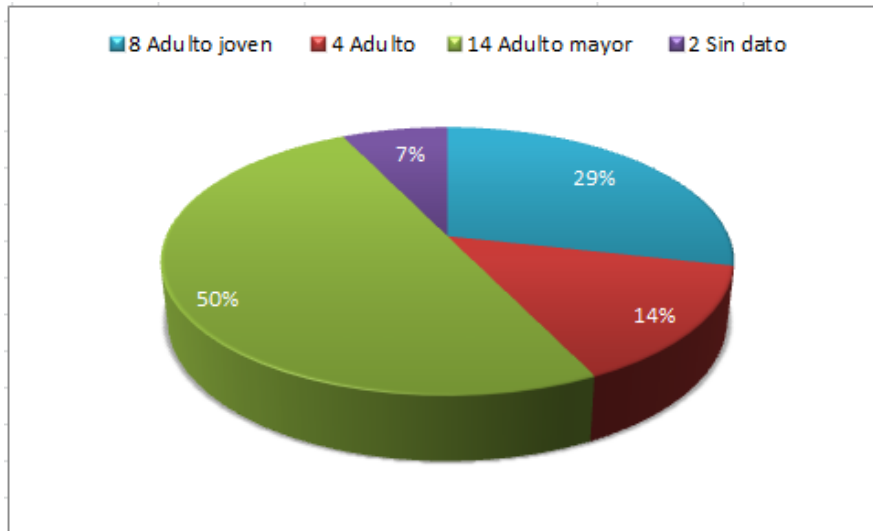


Figura 2.5: Aislamientos por grupo etario

Estudios como el realizado por (Choi et al. 2015; Shin et al. 2018), concuerdan con los datos de grupo etario presentados en este estudio (Figura 2.5), donde se demuestra que el grupo de edad más afectado con este tipo de infecciones son personas adultas mayores, presentando una media de edad 64,5 años. Igualmente, este estudio corresponde a otros artículos publicados en cuanto a género se refiere (Rojas et al. 2017; Shin et al. 2018), ya que exponen que la mayoría de pacientes afectados son hombres, donde el porcentaje de pacientes hombres es del 85.7% y 75% respectivamente.

Para el año 2015 (Rojas et al., 2017) había publicado un estudio sobre 14 aislamientos colombianos de *P. rettgeri* NDM positivos, los cuales fueron reportados durante el 2012 y 2013 en los departamentos de Santander y Cundinamarca. Este estudio reporta 28 aislamientos de *P. rettgeri* recolectados durante el periodo 2015 y 2016, donde 27 de ellos son NDM positivos, además de abarcar más departamentos del país: Santander, Cundinamarca, Bogotá, Valle del Cauca, Risaralda y Sincelejo, dato que refleja un claro aumento de cepas *P. rettgeri* NDM positivos en Colombia en solo cinco años.

2.3.3. Comprobación microbiológica

Para determinar la pureza de los 28 aislamientos criopreservados se realizó una verificación microbiológica a partir de la siembra por aislamiento en medio MacConkey y medio LEEDS para identificar la no fermentación de la

lactosa, la desaminación de la fenilalanina y asegurar el crecimiento de una única población.

Todas las especies de *Acinetobacter baumannii* tienen la capacidad de liberar iones de amoníaco gracias a la utilización de medios nitrogenados a partir de la hidrólisis de caseína y peptona de soja, dando como resultado colonias rosa (Figura 2.6-A). Por otra parte el color marrón de los aislamientos de *P. rettgeri* se produce por una reacción de ácido fenilpirúvico con iones férricos del citrato, esta reacción se da gracias a desaminación de la fenilalanina propia del género *Providencia*. Los 28 aislamientos de *P. rettgeri* presentaron colonias de color marrón (Figura 2.6-B), lo que confirmó que los aislamientos enviados por el INS desaminaban la fenilalanina y se confirmó el género de los aislamientos, asegurándose la pureza de los mismos observando en cada uno de ellos la presencia de una única población.

Adicionalmente, *P. rettgeri* es una Enterobacteria que no utiliza la lactosa como fuente de carbono sino peptona en su lugar formando amoníaco, por tanto en el ambiente con peptona y cloruro de sodio que ofrece el agar MacConkey puede crecer bien. Este medio de cultivo es utilizado para el crecimiento de bacterias Gram negativas y diferenciarlas según su fuente de carbono (Anderson et al., 2013). En el caso de los 28 aislamientos de *P. rettgeri*, formaron amoníaco, lo que incrementó el pH del medio visualizándose colonias de color blanco y/o amarillo, como se evidencia en la Figura 2.7.

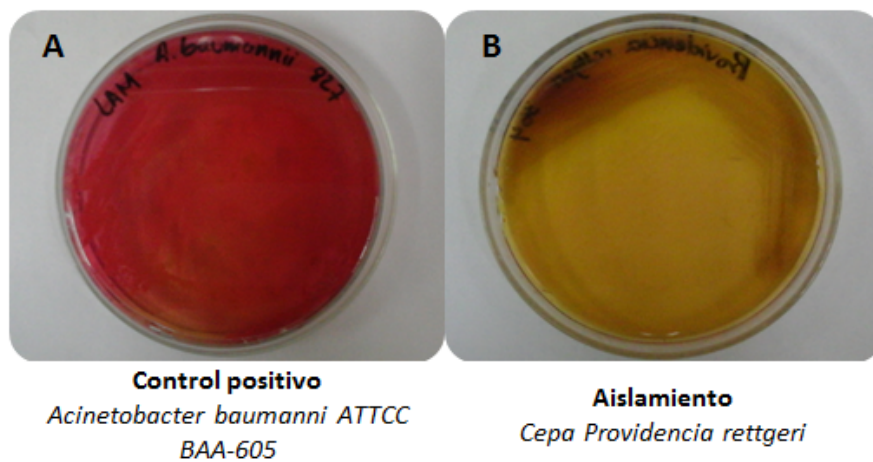


Figura 2.6: Colonias *P. rettgeri* en medio LEEDS. A: muestra el control positivo a partir de la siembra de una ATTCC de *Acinetobacter baumannii* BAA-605 representada por colonias rosa. B: muestra el crecimiento de colonias marrón de un aislamiento de *P. rettgeri* GMR-RA14.



Aislamiento

Cepa *Providencia rettgeri*

Figura 2.7: Colonias *P. rettgeri* en agar MacConkey. Muestra la no fermentación de la lactosa del aislamiento GMR-RA43. Todos los aislamientos fueron sembrados por el método de aislamiento, con el fin de obtener colonias puras y asiladas para comenzar el proceso de extracción de DNA plasmídico.

2.3.4. Obtención de DNA plasmídico

El proceso de extracción de DNA plasmídico se realizó en los 28 aislamientos clínicos con un kit de extracción y purificación fundamentado en el uso de mini-columnas HiBind que se unen de manera específica al DNA, combinado con la técnica de extracción de lisis alcalina de (Bimboim and Doly, 1979).

En términos de concentración y pureza, todas las muestras cumplieron con concentraciones mayores o iguales a 75ug/mL con resultados de relaciones 260/280 nm y 260/230 nm de 1.8-2.0 y 2.0-2.2 respectivamente, lo que demostró que ninguna extracción tenía contaminaciones con proteínas o restos fenólicos, ni sales o carbohidratos (Anexo A).

Igualmente, al momento de visualizar la extracción de los plásmidos de los 28 aislamientos de *P. rettgeri*, se observaron tres perfiles de bandeo definidos: el primero de ellos muestra 1 banda de alto peso molecular dispuesta en 27 de los 28 aislamientos, no obstante solo 13 de ellos presentan únicamente esa banda: GMR-RA43, GMR-RA1152, GMR-RA555, GMR-RA951, GMR-RA278, GMR-RA22216, GMR-RA218, GMR-RA1080, GMR-RA767, GMR-RA44516, GMR-RA649, GMR-RA181 Y GMR-RA7716; el segundo muestra varias bandas dispuestas entre 53.7 KB y 2.1KB en las muestras: GMR-RA1048 y GMR-RA180, GMR-RA43816, GMR-RA14, GMR-RA257, GMR-RA1153, GMR-RA42816, GMR-RA46616, GMR-RA454, GMR-RA38516,

GMR-RA437, GMR-RA13616 y GMR-RA15; y el tercero muestra 1 banda de peso molecular de 2.7KB en la muestra GMR-RA1151 (Figura 2.8).

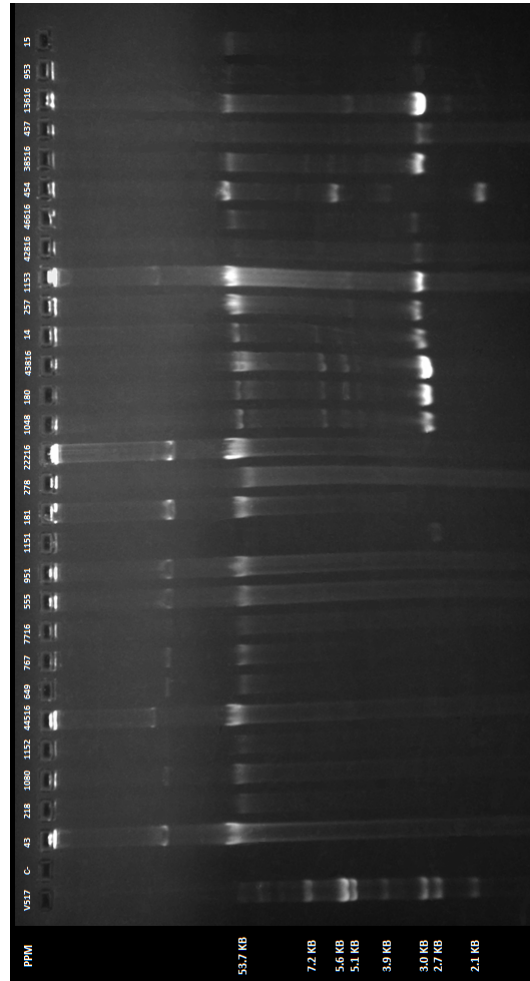


Figura 2.8: Obtención de DNA plasmídico de 28 aislamientos de *P. rettgeri*. La electroforesis fue preparada en gel de agarosa al 1% y corrida en buffer TAE (Tris-Ácido acético-EDTA) al 1X, el cual contiene un total de 30 pozos. V517: patrón de peso molecular para plásmidos, relacionado en la parte izquierda de la foto. C-: control negativo de agua HPLC.

Por otro lado, el dendograma (Figura 2.9) da una idea del grado de similitud entre ellas y expone tres cluster representados por los clados A (GMR-RA1151), B (GMR-RA555 - GMR-RA437) y C (GMR-RA14 - GMR-RA454).

El clado A (Figura 2.9) conformado únicamente por el aislamiento GMR-RA1151, que se separa del conjunto de aislamientos totales, lo que puede estar correlacionado con la ausencia del gen bla_{NDM-1} (Tabla 2.1), ya que la banda observable es pequeña, sugiriendo la presencia de un plásmido <40KB, donde la presencia de este gen no tiene cabida puesto que ha sido vinculado a plásmidos conjugativos >40KB en varias especies Gram negativas (Patel and Bonomo 2013; Nordmann et al. 2011a), particularmente de tipo IncA/C2 (Marquez-Ortiz et al., 2017a).

Por su parte, el clado B de extracciones plasmídicas (Figura 2.9), se caracteriza por presentar una sola banda de alto peso molecular conservada en 27 de los 28 aislamientos de *P. rettgeri* (Figura 2.8) de igual forma, 10 de las 14 extracciones plasmídicas de este agrupamiento pertenecen a aislados de origen urinario (71,4%), seguido por sangre (14,3%), abscesos de pie (7,2%) y hueso (7,2%). 3 de los 14 fueron reportados en el 2016 (GMR-RA44516, GMR-RA22216 y GMR-RA7716) y únicamente 2 (GMR-RA767 y GMR-RA218) no fueron aislados en Bogotá (Anexo B). Cabe señalar que en este clado se presentan relaciones sociodemográficas entre los aislados de origen de GMR-RA649 y GMR-RA181; GMR-RA951 y GMR-RA278; y GMR-RA7716 y GMR-RA22216. El primero de ellos (GMR-RA649 y GMR-RA181) corresponde a plásmidos extraídos de aislamientos provenientes de la ciudad de Bogotá reportados en el hospital 9 durante el año 2015, ambos de muestras de orina y con un diagnóstico de IVU (Infección en Vías Urinarias) en ambos pacientes. El segundo (GMR-RA951 y GMR-RA278) corresponde a plásmidos extraídos de aislamientos provenientes de la ciudad de Bogotá reportados en el hospital 16 durante el año 2015, ambos de muestras de orina y al menos un paciente diagnosticado con IVU. Y el tercero (GMR-RA7716 y GMR-RA22216) corresponde a plásmidos extraídos de aislamientos rST63073 provenientes de la ciudad de Bogotá, aislados en el hospital 2 durante el año 2016, ambos de muestras de orina de pacientes diagnosticados con cáncer y con estancias prolongadas en esa unidad hospitalaria (Anexo B). Sin embargo estas relaciones posiblemente clónales no son las únicas que se presentan en todo el set de los 28 aislamientos de *P. rettgeri*. Existen varios de la ciudad Bogotá y de otras regiones del país que se desarrollaran en la descripción del clado C; es importante mencionar además, que estos posibles clones poseen una banda en común, sugiriendo la presencia de un megaplásmido compartido con alta probabilidad de contener el gen bla_{NDM-1} , no obstante el análisis del perfil de resistencia de estas secuencias (desarrollado en los capítulos 3 y 4) deberá confirmar o refutar esta hipótesis.

Asimismo, el rST de los aislados fue rST63073 (GMR-RA555, GMR-RA1152, GMR-RA43, GMR-RA1080, GMR-RA181 y GMR-RA951), mencionado en el estudio "Análisis comparativo de elementos genómicos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri* durante el periodo 2015-2016", realizado por los grupos de Bioinformática y epidemiología molecular de Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional-sede Bogotá, mostrando que 6 de los 14 aislados tienen el mismo

rST que estaba circulando en el año 2015 en distintas unidades hospitalarias de la ciudad de Bogotá; todos ellos aislados de muestras de orina y sangre en pacientes con un promedio de edad de 73 años. Igualmente cabe mencionar que en el marco del estudio genómico preliminar de estas muestras, se determinaron otros rST: rST63073, rST61696, rST89602, rST89603, rST63074, rST63075, rST63141 y rST89601, en donde rST63073 estuvo representado en la mayoría de las muestras (n=13).

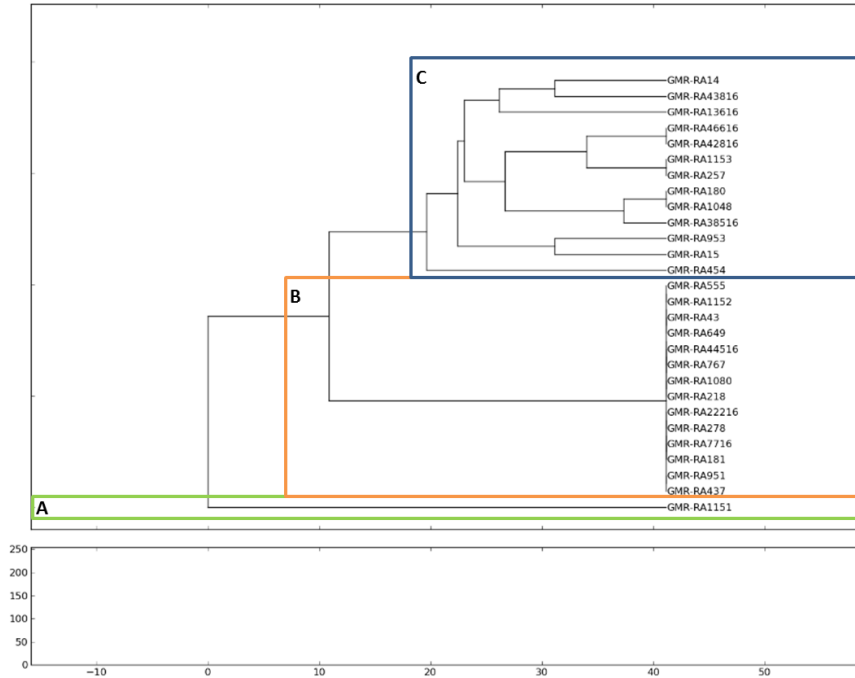


Figura 2.9: Dendrograma de agrupamiento de los plásmidos extraídos de los 28 aislamientos de *P. rettgeri*. Agrupamiento de acuerdo al patrón de bandas de DNA plasmídico de 28 muestras de *P. rettgeri*, observadas en la electroforesis en gel de agarosa, realizado con el algoritmo UPGMA de PyElph v1.4, donde se muestran tres agrupamientos representados por los clados A (en color verde), B (en color naranja) y C (en color azul).

Finalmente el clado C de extracciones plasmídicas (Figura 2.9), se caracteriza por ser de mayor variabilidad, donde existen varias bandas dispuestas en distintos pesos moleculares (Figura 2.8). De igual forma 12 de las 13 extracciones plasmídicas pertenecen a aislados de origen urinario (92,3%), solo una tiene su origen en una muestra de tejido muscular (7,7%), 4 de los 13 fueron reportados durante el año 2016 (GMR-RA38516, GMR-RA42816,

GMR-RA43816 y GMR-RA46616) y solo 5 no fueron aislados en Bogotá (Anexo B).

Inicialmente, la variabilidad esta dada por la presencia de varias bandas obtenidas a partir de los extractos plasmídicos que conforman este clado, a diferencia de los clados A y B en los que se obtiene una sola banda; esto podría sugerir que en algunas cepas de *P. rettgeri* hay más de un plásmido, aunque hasta el momento no se ha reportado ese tipo de eventos en cepas de *p. rettgeri*. En segundo lugar, aunque es difícil saber el número exacto de plásmidos por el número de bandas, dado que algunas bandas pueden tomar diferentes conformaciones a lo largo del corrido electroforético, variaciones que pueden deberse a distintas estructuras conformacionales tomadas por una misma secuencia, las cuales migran a diferentes velocidades produciendo mas de una banda del mismo fragmento de secuencia durante la separación por electroforesis. Del mismo modo, la variación en el número de bandas va desde las cinco bandas presentadas en GMR-RA14, GMR-RA43816, GMR-RA180, GMR-RA38516 y GMR-RA1048 con pesos moleculares entre 53.7KB y 2.7KB, hasta dos bandas presentadas en GMR-RA44516, GMR-RA46616, GMR-RA953 y GMR-RA15 con pesos moleculares de 53.7KB y 3.0KB. Los demás extractos plasmídicos (GMR-RA13616, GMR-RA1153, GMR-RA257 y GMR-RA454) muestran entre tres y cuatro bandas distribuidas entre 53.7KB y 2.1KB.

Por otra parte, en el clado C se observan dos subclados, el primero de ellos (GMR-RA257 y GMR-RA1153) tiene su origen en muestras de orina de pacientes adulto y adulto mayor respectivamente, diagnosticados con IVU y fueron aislados en la misma unidad hospitalaria (H11) de la ciudad de Bogotá durante el año 2015 (Anexo B); de igual forma estos aislados fueron descritos como clones de acuerdo a la relación genómica y a su perfil de resistencia en el estudio preliminar con secuencias del genoma completo. Por su parte el segundo subclado, GMR-RA42816 y GMR-RA46616, tiene su origen en muestras de orina de pacientes adulto mayor y adulto, diagnosticados con insuficiencia cardíaca e insuficiencia renal crónica respectivamente y fueron aislados en la misma unidad hospitalaria (H1) de la ciudad de Pereira durante el año 2016, y también con una posible relación clonal. Sin embargo esta relación deberá ser confirmada en el análisis de genes asociados a la resistencia a antibióticos de las secuencias plasmídicas (desarrollado en los capítulos 3 y 4).

Es importante mencionar que todos los plásmidos extraídos del clado C tienen en común una banda alto peso molecular, patrón similar al presentado por el clado B, lo que sugiere que pueden albergar el gen bla_{NDM-1} , confiriéndoles resistencia a antibióticos carbapenémicos a los aislados, lo que coincide con la resistencia fenotípica a imipenem, meropenem y ertapenem mostrada en el marco del estudio preliminar de las secuencias genómicas de estos aislados mencionado anteriormente.

En conclusión y como se evidencia en la Figura 2.8, la presencia de plásmidos fue demostrada en los 28 aislamientos de *P. rettgeri*. En general todas las muestras presentan una banda en común que ronda los 53.7 KB, a excepción

de la muestra GMR-RA1151. Este resultado coincide con la identificación molecular de genes RAM realizada por el INS (Tabla 2.1) lo que podría indicar de manera especulativa que 27 de los 28 aislamientos de *P. rettgeri* poseen el gen *bla_{NDM-1}*, teniendo en cuenta que este gen ha sido asociado a plásmidos > 40 KB en cepas de *P. rettgeri* (Marquez-Ortiz et al. 2017b; Marquez-Ortiz et al. 2017a), cepas de *Klebsiella pneumoniae* (Rojas et al., 2016), cepas de *Acinetobacter baumannii* (Hu et al. 2012; Toleman et al. 2012) y cepas de otras bacterias Gram negativas (Walsh et al., 2011). Sin embargo para demostrar que estas bandas están albergando este gen, es necesario realizar un análisis de las secuencias de cada una de las muestras. Es evidente que el uso de metodologías de extracción rápida de plásmidos como los kits comerciales u otras técnicas convencionales, no proveen una información robusta del plasmidoma (Dib et al., 2015) y deben ser complementadas con el uso de otras técnicas moleculares.

Por último se identificaron dos clados grandes, en donde el clado B se caracterizó por la presencia de una sola banda con un peso molecular muy similar, y el clado C, se caracterizó por su mayor número de bandas y alta variabilidad; No obstante no parece existir ninguna relación directa de estos agrupamientos con la tipificación realizada en el genoma completo de estos aislamientos, aunque en el clado B hay algunos extractos plasmídicos de aislados que fueron tipificados como mismo rST.

Por lo anterior, el enfoque bioinformático del presente estudio pretende realizar la caracterización de las secuencias plasmídicas de los aislamientos de *P. rettgeri* obtenidas durante el estudio preliminar antes mencionado, utilizando la metodología de nueva generación Illumina HiSeq2500, con el fin de dar mayor resolución y resolver el ambiente genético asociado a la presencia de plásmidos y a la resistencia a antimicrobianos asociados a estos.

Capítulo 3

Determinación de las características genéticas de los contigs asociadas a la resistencia en *P. rettgeri*

3.1. Introducción

Típicamente la obtención de plásmidos se realiza a través del uso de técnicas de extracción moleculares basadas en lisis alcalina (Bimboim and Doly, 1979), combinadas con tecnologías fundamentadas en sílica y/o de intercambio aniónico y luego es evaluada mediante una electroforesis donde se detecta la presencia de perfiles de bandeo de distintos pesos moleculares. No obstante, aunque el uso de estas técnicas está ampliamente distribuido y el uso de kits comerciales hacen el proceso más práctico, en su mayoría estos no aseguran la extracción completa de megaplásmidos (Smalla et al. 2015; Conlan et al. 2014) ni tampoco verifican las características presentes en ellos. En contraste la obtención del genoma completo bacteriano y su posterior secuenciación en plataformas de alto rendimiento "Next Generation Sequencing" (NGS), permite la creación de bastas librerías de "reads" o lecturas cortas que mejoran la resolución y pueden ser ensambladas gracias a herramientas bioinformáticas diseñadas para ello (Arredondo-Alonso et al., 2017) y por tanto permite obtener información de las secuencias que componen los plásmidos y de los elementos genómicos que contienen. Sin embargo cuando se utilizan *reads* cortos, como los producidos por tecnologías como Illumina, los ensamblados producidos corresponden a una mezcla de segmentos de secuencias (*contigs*) que no se diferencian y que pueden ser parte del cromosoma o de plásmidos presentes en la bacteria secuenciada.

Se han desarrollado programas bioinformáticos que permiten discernir entre los dos tipos de secuencias de DNA (De Toro et al., 2015), como son: PlasmidSPAdes (Antipov et al., 2016), PlasFlow (Krawczyk et al., 2018), cBar (Zhou and Xu, 2010), PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014), Recycler (Rozov et al., 2017), PLACNET (Vielva et al., 2017) y Plascope (Royer et al., 2018).

Por lo anterior, el presente trabajo se planteó como segundo objetivo: determinar las características genéticas de los *contigs* plasmídicos asociadas a

la resistencia a antibióticos en aislamientos de *Providencia rettgeri* en estudio. Esta caracterización se realizó a través de un flujo de trabajo bioinformático desarrollado por el grupo de Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia- sede Bogotá.

3.2. Metodología

3.2.1. Construcción del pipeline

Este *pipeline* está escrito en Python v. 3.7 (<https://www.python.org/>) e implementa una serie de herramientas y estrategias bioinformáticas, que serán descritas a continuación:

3.2.1.1. Ensamblaje *De novo* de reads genómicos de *P. rettgeri*

El ensamblaje de los genomas de cada uno de los aislamientos de *P. rettgeri* se realizó utilizando SPAdes v 3.8.0 (Bankevich et al., 2012) usando los siguientes tamaños de K-mer: 41, 67, 73 y 87, que fueron definidos utilizando KmerGenie, una herramienta de selección de K-mers para la optimización del ensamblaje de genoma completo (Chikhi and Medvedev, 2013). Finalmente se evaluó la calidad del ensamblaje mediante QUAST (Gurevich et al., 2013).

3.2.1.2. Clasificación de contigs plasmídicos a partir de PlasmidSPAdes

PlasmidSPAdes fue escogido ya que ofrece un enfoque visto desde el análisis de profundidad de las secuencias obtenidas del ensamblaje por SPAdes, recalculando el grafo de brujin donde se tienen en cuenta los subgrafos y convirtiéndolo en el grafo de ensamblaje de plásmidos (Bankevich et al., 2012).

PlasmidSPAdes fue usado para el ensamblaje de *contigs* asociados a plásmidos considerando los mismos parámetros mencionados para el ensamblaje *de novo* realizado por SPAdes, seguido por la selección de *contigs* de tamaño mayor a 1000pb. Se realizó un alineamiento blastn entre los *contigs* generados por SPAdes y los *contigs* generados por PlasmidSPAdes (ya que los nombres de los *contigs* es diferente entre PlasmidSPAdes y SPAdes), con el fin de obtener una lista de los *contigs* generados por SPAdes que tuvieran un porcentaje de identidad y cobertura del 100 % respecto a los *contigs* generados por PlasmidSPAdes. La lista es utilizada posteriormente para la selección de los *contigs* que posiblemente pueden formar parte de los plásmidos presentes en cada aislamiento.

3.2.1.3. Clasificación de *contigs* plasmídicos a partir de PlasFlow

Plasflow se escogió abarcando un enfoque de predicción por redes neuronales y frecuencias de k-mers normalizados que permiten clasificar *contigs* plasmídicos y *contigs* cromosomales a partir de secuencias metagenómicas, aunque puede ser aplicado para secuencias genómicas. Alcanza una precisión de hasta el 96 % recuperando secuencias plasmídicas circulares y lineales filtrando *contigs* de hasta 1000pb. Además, Plasflow resulta especialmente beneficioso cuando se trabaja con *contigs* de gran tamaño generados del ensamblaje. Por ejemplo SPAdes, ya que facilita el ensamblaje de secuencias plasmídicas por *scaffolding* y cerrado de gaps permitiendo extraer información de la estructura genómica (Krawczyk et al., 2018).

PlasFlow v 1.1.3 fue utilizado con los parámetros por defecto que ofrece la herramienta, empleando los *contigs* generados por SPAdes para la generación de una lista de posibles *contigs* plasmídicos.

3.2.1.4. Clasificación de *contigs* plasmídicos a partir del alineamiento contra la base de datos de cromosomas

Fueron descargadas todas las secuencias genómicas de *Providencia rettgeri* que se encontraban disponibles hasta el 28 de Mayo de 2019 en la base de datos Genome del NCBI. Actualmente se encuentran almacenadas en el servidor del grupo de Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia - sede Bogotá.

Se realizó un alineamiento blastn entre los *contigs* generados por SPAdes y una base de datos blast creada con las secuencias genómicas descargadas de *P. rettgeri*. Fueron seleccionados como parte de las secuencias plasmídicas aquellos *contigs* ensamblados con SPAdes que no tuvieran *hits* o que se alinearan con alguna secuencia de la base de datos con un porcentaje de identidad < 100 % y un porcentaje de cobertura no mayor al 97 %.

3.2.1.5. Clasificación de *contigs* plasmídicos a partir del alineamiento contra la base de datos de plásmidos

Asimismo, fueron descargadas 18.000 secuencias plasmídicas de Enterobacterias que se encontraban disponibles hasta el 19 de Diciembre de 2019 en la base de datos Genome del NCBI. De igual forma se encuentran almacenadas en el servidor del grupo de Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia - sede Bogotá.

Se realizó un alineamiento blastn entre los *contigs* generados por SPAdes y una base de datos blast creada con las secuencias de plásmidos descargadas del NCBI. Se seleccionaron como posibles secuencias de plásmidos todos los *contigs* ensamblados con SPAdes que alinearan con alguna secuencia de la

base de datos con un porcentaje de identidad $> 90\%$ y un porcentaje de cobertura $> 90\%$.

3.2.1.6. Clasificación de *contigs* plasmídicos a partir de datos de profundidad de las secuencias

Se implementó un *script* en python que obtuvo la profundidad de cada *contig* y determinó, de acuerdo a la distribución de los datos, el límite superior a partir del cual el valor de profundidad de cada *contig* puede considerarse como un *outlier* extremo utilizando la ecuación $(Q1-Q3)*3$, donde Q1 y Q3 corresponden al primer y tercer cuantil de la distribución de los datos de profundidad respectivamente. El *script* integrado al *pipeline*, genera una lista de los *contigs* con profundidades mayores al valor calculado. Este *script* fue desarrollado por el grupo de Bioinformática de Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional- sede Bogotá (Anexo E).

3.2.1.7. Consolidación de los resultados para la selección final *contigs* plasmídicos

El *script* python verificó la lista de *contigs* posiblemente plasmídicos generados por cada herramienta y generó un archivo MULTIFASTA con los *contigs* plasmídicos clasificados por dos o más herramientas: PlasmidSPAdes, Plasflow, *contigs* alineados con la base de datos de plásmidos, *contigs* no alienados con la base de datos de cromosoma y *contigs* con *outliers* extremos, conglomerados en una tabla final por aislamiento (Anexo D).

En resumen, para conseguir la clasificación de los *contigs* a partir del genoma completo se partió de un conjunto de *reads* previamente secuenciados, editados y evaluados mediante Ilimina Hiseq2500, Sickle y QUASt respectivamente. Este conjunto de *reads* se usó como input para el *pipeline*: I) En primer lugar SPAdes realizó el ensamblaje *De novo* de genoma completo de cada aislamiento. II) En seguida, el *pipeline* realizó el ensamblaje con PlasmidSPAdes para obtener los *contigs* de plásmidos, usando los mismos tamaños de K-mers utilizados por SPAdes. Asimismo el *pipeline* solo seleccionó los *contigs* $> 1000pb$. III) A continuación, se realizó un alineamiento blastn de los *contigs* generados por PlasmidSPAdes contra los ensamblados de SPAdes, con el fin de obtener una lista de *contigs* ensamblados por SPAdes correspondiente en un 100% de identidad y cobertura a los ensamblados por PlasmidSPAdes. IV) Se efectuó el alineamiento de los *contigs* de SPAdes contra las bases de datos: ChromosomeDB y PlasmidDB, generando dos nuevos listados de *contigs* posiblemente asociados a plásmidos. V) A continuación se generó una cuarta lista de *contigs* de SPAdes utilizando PlasFlow. VI) y finalmente el *pipeline* generó una quinta lista de *contigs* de SPAdes a partir del análisis de la profundidad de los mismos (Figura 3.1).

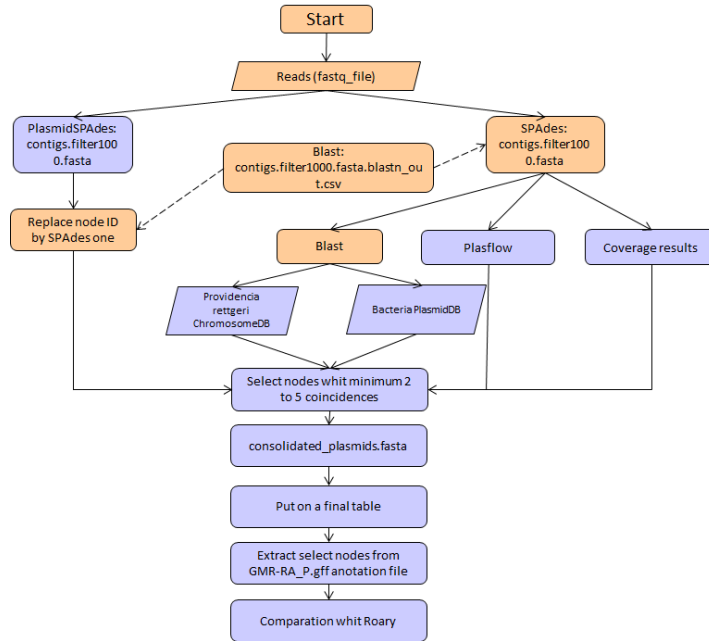


Figura 3.1: Flujo de trabajo para la clasificación de posibles *contigs* asociados a plásmidos. Cuadros azules: cinco métodos de clasificación empleados por el *pipeline* y cinco órdenes de selección, consolidación, disposición, anotación y comparación de los datos. Cuadros naranja: *fastq_file reads*, el ensamblaje del genoma completo con la obtención de un grupo de *contigs* indiscriminados por aislamiento y los alineamientos contra los *contigs* de PlasmidSPAdes y contra las bases de datos: Plásmidos y Cromosomas.

3.2.2. Anotación de los elementos genéticos en *contigs* plasmídicos de *P. rettgeri*

La anotación de características genéticas de los posibles *contigs* plasmídicos se ejecutó por medio de Prokka v1.14.0 (Seemann, 2014), una herramienta software de línea de comandos que utiliza cinco herramientas distintas capaces de predecir distintas particularidades dentro de *contigs* (Tabla 3.1). Adicionalmente permite la incorporación de otras bases de datos, lo que se aprovechó incorporando tres bases de datos: I) base de datos de genes y proteínas asociados a la resistencia antimicrobiana construida desde la búsqueda exhaustiva en literatura indexada, realizada por el grupo de bioinformática; II) base de datos curada Resfam (Gibson et al., 2015), que contiene familias de proteínas asociadas a modelos ocultos de Markov (HMM) y III) base de datos de resistencia a antimicrobianos CARD (McArthur et al., 2013).

Herramienta	Predicción
Prodigal (Hyatt et al., 2010)	Secuencia de codificación (CDS)
RNAmmer (Lagesen et al., 2007)	Genes RNA ribosomales
Aragorn (Laslett and Canback, 2004)	Genes RNA de transferencia
SignalP (Petersen et al., 2011)	Péptidos señal
Infernal (Kolbe and Eddy, 2011)	RNA no codificante

Tabla 3.1: Herramientas Prokka para la anotación de secuencias DNA. Tomado y modificado de (Seemann, 2014).

3.2.3. *Determinación de los genes de resistencia en contigs plasmídicos de P. rettgeri*

La determinación de los genes de resistencia de los posibles *contigs* asociados a plásmidos de *P. rettgeri*, fue realizada a través de un software RGI (Identificador de Genes de Resistencia) vinculado a la base de datos integral de resistencia a antibióticos CARD que cuenta con secuencias de referencia (DNA y proteínas) de genes bacterianos asociados a la resistencia (Alcock et al., 2019).

El software fue Instalado y ejecutado a través de un *script* de lenguaje bash en un sistema operativo Linux opensuse leap 42.3.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. *Ensamblaje de genomas de P. rettgeri*

El ensamblaje de los 28 genomas completos en estudio realizados por SPAdes v3.8.0 puede verse en el Anexo C y los promedios de los mismos en la Tabla 3.2: Estos resultados muestran en promedio 38 *contigs* a una profundidad de 510X lecturas por base oscilando entre 138X y 918X, lo que permitió un número mayor de *reads* únicos por secuencia de nucleótido logrando menos errores en la secuencia genómica obtenida para cada uno de los aislamientos.

Asimismo se obtuvo un promedio de tamaño de genoma de 4.8Mb oscilando entre 4.5Mb a 5.0Mb, resultados que concuerdan con los ensamblajes de *P. rettgeri* publicados (Galac and Lazzaro 2012; Olaitan et al. 2015; Marquez-Ortiz et al. 2017b). Esta variación entre los tamaños del genoma puede deberse a la presencia de plásmidos en cada uno de ellos como es el caso del primer genoma de *P. rettgeri*-NDM positivo publicado en Colombia (Marquez-Ortiz et al., 2017b).

El N50 en promedio fue de 220566pb, oscilando entre 146975pb y 485478pb, valores que indican que los ensamblajes obtenidos son buenos, considerando que con pocos *contigs* se cubre el 50 % de los genomas secuenciados.

Por otro lado estos resultados muestran un %GC promedio de 40,54 %, resultados que concuerdan con los datos de genomas de *P. rettgeri* previamente publicados, al igual que ocurre con la identificación en promedio de 4459 secuencias codificantes (CDs) y 4529 genes predichos (Olaitan et al., 2015). Además, se encontraron en promedio de 69 RNAs de transferencia oscilando entre 68 y 75 tRNAs y 7 RNA ribosomales, concordando con otras publicaciones de genomas de *P. rettgeri* (Wang and Brucker, 2019).

Valores ensamblajes evaluados	N° de contigs	Profundidad	Tamaño del genoma	N 50	% GC	CDS	tRNA	rRNA	Genes predichos
Valor mínimo	34	138x	4.553.004	146975	40.07	4173	68	4	4255
Promedio	58	510x	4.800.085	220566	40.54	4459	69	7	4529
Valor máximo	79	918x	5.044.054	485478	40.87	4739	75	10	4809

Tabla 3.2: Resultados promedios del ensamblaje de los genomas de *P. rettgeri* con SPAdes

3.3.2. *Obtención de contigs de P. retterii asociados a plásmidos*

El uso del *pipeline* comprende la combinación de cinco distintas metodologías de selección de *contigs* asociados a plásmidos (PlasmidSPAdes, PlasFlow, variación de profundidad, alineamiento blastn contra ChromosomeDB y PlasmidDB) con el fin de mejorar la precisión a la hora de seleccionar estos *contigs*, debido a que las herramientas disponibles hasta el momento por sí solas no garantizan una selección y agrupamiento de estos de manera completa y precisa a pesar de basarse en distintas metodologías (Arredondo-Alonso et al., 2017); por ello la selección final de los *contigs* posiblemente asociados a secuencias plasmídicas, se realizó teniendo en cuenta aquellos *contigs* seleccionados por dos o más de los cinco métodos utilizados, los cuales fueron consolidados en un archivo .FASTA (*consolidated_plasmids*) para cada uno de los aislamientos GMR-RA_P y fueron dispuestos en una tabla de clasificación final. Cabe señalar que con este mínimo límite de *contigs* identificados por 2 o más de los cinco métodos de clasificación, se observó que todos los *consolidated_plasmids* por aislamiento contenían un *contig* que albergaba el gen bla_{NDM-1} ; esto se conocía previamente desde la anotación los elementos genómicos de cada genoma completo de los 28 aislamientos publicado en el "Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri* durante el periodo 2015-2016". En conclusión este límite mínimo permitió la identificación del gen en 27 de 28 consolidados plasmídicos de *P. rettgeri* de estudio.

En general 568 *contigs* fueron seleccionados como posibles secuencias asociadas a plásmidos (Anexo D), con un promedio de 20 *contigs* por aislamiento, de los cuales 23,6 % (n=134) fueron identificados por su variabilidad de profundidad o *Deep coverage*; 58,4 % (n=332) fueron identificados por PlasmidSPAdes; 71,5 % (n=406) por PlasFlow, 66 % (n=375) fueron *contigs* que alinearon con porcentaje de identidad y cobertura < 100 % frente a la base de datos de cromosomas y 80,2 % (n=456) alinearon contra la base de datos de plásmidos con un porcentaje de identidad y cobertura > 90 %. Asimismo, el 98,4 % (n=559) de los *contigs* fue identificado por al menos una de las dos bases de datos (Tabla 3.3). Estos datos demuestran que el alineamiento contra las bases de datos de plásmidos reportados proporcionan mayor número de *contigs* posiblemente plasmídicos, mientras que el alineamiento contra la base de datos de cromosomas de *P. rettgeri* reportados, descarta hasta el 77 % de *contigs* del ensamblaje de genoma completo, que deben corresponder a secuencias cromosomales.

De acuerdo a la identificación de la presencia de bla_{NDM-1} , 27 de los 28 aislamientos contenían el gen (96,4 %), el 7,4 % (n=2) de los *contigs* que albergaban el gen fueron identificados por su variabilidad de profundidad o *Deep coverage*; 59,2 % (n=16) fueron identificados por PlasmidSPAdes; 70,4 % (n=19) por PlasFlow; 99,3 % (n=26) alinearon contra la base de datos

de plásmidos con porcentaje de identidad y cobertura $> 90\%$ y el 100% ($n=27$) pertenecían a *contigs* que alinearon con un porcentaje de identidad y cobertura $< 100\%$ frente a la base de datos de cromosoma. Igualmente el $99,3\%$ ($n=26$) de estos *contigs* fueron identificados por las dos bases de datos (Tabla 3.4). Los datos aquí presentados evidencian que la identificación del gen bla_{NDM-1} resultó ser más precisa por medio del alineamiento contra la base de datos de secuencias cromosómicas. Esto indica que este tipo de comparación puede ser muy útil para discernir entre secuencias plasmídicas y cromosomales, ya que los plásmidos contienen algunas secuencias que no se han reportado en el cromosoma, como ocurre con el gen bla_{NDM-1} (Yong et al. 2009; Gao et al. 2020), que hacen que la secuencia no se alinee al 100% de identidad con las de la base de datos de cromosomas, haciéndola candidata a formar parte de los *contigs* asociados a plásmidos.

568 <i>contigs</i> posiblemente plasmídicos	
23,6% (n= 134)	Deep coverage
58,4% (n= 332)	PlasmidSPAdes
66% (n= 375)	Blastn ChromDB
71,5% (n= 406)	PlasFlow
80, 2% (n= 456)	Blastn PlasmidsDB
98,4% (n= 559)	Blastn ChromDB/PlasmidsDB

Tabla 3.3: Obtención de *contigs* asociados a plásmidos en 28 aislamientos de *P. rettgeri*

27 <i>contigs bla_{NDM-1}</i>	
7,4% (n= 2)	Deep coverage
59,2% (n= 16)	PlasmidSPAdes
70,4% (n= 19)	PlasFlow
99, 3% (n= 26)	Blastn PlasmidsDB
100% (n= 27)	Blastn ChromDB
99,3% (n=26)	Blastn ChromDB/PlasmidDB

Tabla 3.4: Identificación de *contigs*-NDM-1 asociados a plásmidos en 28 aislamientos de *P. rettgeri*

Como se observa en la Figura 3.2, cuando se utiliza un parámetro de un *contig* plasmídico que sea clasificado por 2 o más herramientas de 5 propuestas, el número de genes seleccionados es mayor con un posible aumento de falsos positivos. No obstante se tendría un menor número de falsos negativos, como lo demuestran los resultados, ya que al usar bla_{NDM-1} como indicador, determinado por PCR en todos los aislamientos (27 positivos, 1 negativo), se evidencia que cuando el parámetro se ajusta a 2 herramientas

clasificadoras, el *contig* donde está presente este gen siempre es identificado y clasificado correctamente. En general todos los ensamblados analizados bajo esta condición tendrán posiblemente algunos errores de selección, aunque al ser tratados todos de la misma forma resulta viable comparar los resultados de unos con otros y así estimar las similitudes y diferencias entre *contigs* plasmídicos encontrados en cada aislamiento.

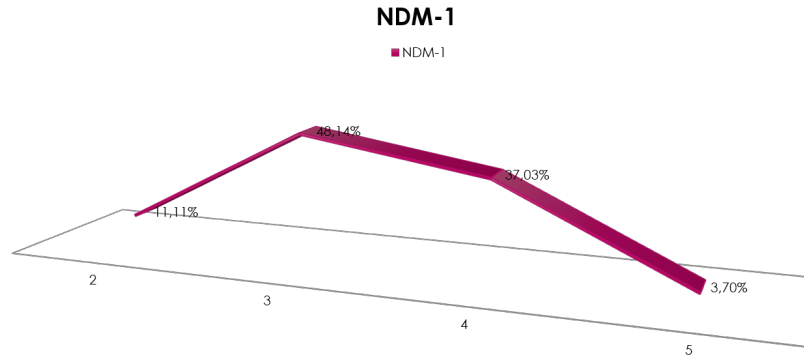


Figura 3.2: Restricción del método para la selección de *contigs* asociados a plásmidos, a partir del uso de bla_{NDM-1} como indicador. En Morado: el porcentaje del total de *contigs* NDM-1 asignados por método, a partir del 100 % de *contigs*-NDM-1 que fueron clasificados como plasmídicos (n=27).

Por otra parte, el número total de pares de bases de las secuencias posiblemente asociadas a plásmidos constituyó el 6 % (10.2Mb) del total de pares de bases, con un promedio de 364Kb por aislamiento. Igualmente, la suma de tamaños de cada uno de estos *contigs* oscilaron entre 206Kb a 1.0Mb, y aunque particularmente en *P. rettgeri* el plásmido más grande reportado es de 224Kb (Marquez-Ortiz et al., 2017a) ya se ha publicado la existencia de un plásmido de 1.02Mb en una cepa de *Acinetobacter baumannii*-VB31459 por Veeraraghavan,B y colaboradores. Lo anterior implica que las bacterias Gram negativas son capaces de captar megaplásmidos de esa longitud, posiblemente con mayor número de genes asociados a la resistencia a antimicrobianos a comparación de otros megaplásmidos reportados de menor longitud, además de otros genes asociados a la virulencia y metabolismo celular. Asimismo la capacidad de adquirir nuevos elementos genéticos por parte de estas secuencias contribuye a la evolución de las cepas que las albergan (Tolmasky and Alonso, 2015).

Aislamiento	contig.id	Cover	plasmidS	PlasF	Chrom DB	Plasm DB	Ttest	N° contigs	Tamaños	N° contigs Chrom
GMR-RA14	NODE_39	1	1	0	0	1	3	11	1746	28
	NODE_25	0	0	1	1	1	3		41478	
	NODE_38	1	1	0	0	1	3		1763	
	NODE_30	0	0	1	0	1	2		14607	
	NODE_28	0	1	1	0	1	3		17091	
	NODE_15	0	0	1	1	1	3		65158	
	NODE_37	0	0	1	1	0	2		1856	
	NODE_36	1	1	1	1	0	4		1945	
	NODE_17	0	1	1	0	1	3		63574	
	NODE_31	1	1	0	1	0	3		12965	
	NODE_32	0	1	1	1	1	4		9192	
GMR-RA15	NODE_55	1	0	0	1	1	3	16	1303	42
	NODE_51	0	0	1	0	1	2		2076	
	NODE_23	0	0	1	1	0	2		86035	
	NODE_35	0	1	1	0	1	3		28034	
	NODE_54	0	0	1	1	1	3		1570	
	NODE_46	0	0	1	0	1	2		11930	
	NODE_44	0	0	1	1	1	3		18016	
	NODE_42	0	0	1	1	1	3		19204	
	NODE_57	1	0	0	0	1	2		1139	
	NODE_28	0	1	1	0	1	3		49966	
	NODE_31	0	1	0	1	0	2		34025	
	NODE_53	0	0	1	1	0	2		1655	
	NODE_48	0	0	1	1	1	3		7572	
	NODE_58	1	0	0	0	1	2		1113	
	NODE_33	1	1	1	1	1	5		29675	
	NODE_47	0	0	1	1	1	3		8314	
GMR-RA44516	NODE_44	1	1	1	1	0	4	10	1813	40
	NODE_46	1	0	1	0	0	2		1441	
	NODE_36	1	0	1	0	1	3		14606	
	NODE_23	1	1	0	1	0	3		64898	
	NODE_48	1	0	0	0	1	2		1345	
	NODE_45	1	0	0	0	1	2		1459	
	NODE_49	1	0	1	0	0	2		1279	
	NODE_25	0	0	1	1	1	3		59033	
	NODE_34	0	0	1	1	0	2		19204	
	NODE_30	0	0	1	1	1	3		41478	

Tabla 3.5: *contigs* seleccionados como posiblemente plasmídicos. En rosa: conjunto de *contigs* que habían sido identificados inicialmente con un parámetro de restricción de 3 herramientas de 5. En Azul: conjunto de *contigs* que habían sido identificados inicialmente al actualizar la base de datos de plásmidos. En Amarillo: conjunto de *contigs* que no habían sido identificados con ninguna de las dos estrategias anteriores pero si con un parámetro de restricción final de 2 herramientas de 5. Adicionalmente Los *contigs* resaltados en esos colores son aquellos que albergan el gen bla_{NDM-1} .

Por otra parte, fueron identificados de acuerdo al tamaño de las secuencias clasificadas por el *Pipeline* como posiblemente plasmídicas, 76 *contigs* mayores a 40Kb, secuencias que pueden estar haciendo parte de megaplásmidos (Patel and Bonomo 2013; Tolmasky and Alonso 2015), distribuidos en los 28 aislamientos de estudio (Anexo D).

Asimismo, 5 *contigs*-NDM-1 de distintos tamaños se comparten entre 19 aislamientos (*contig*-NDM-1 de 9192pb, *contig*-NDM-1 de 19204pb, *contig*-NDM-1 de 19201pb, *contig*-NDM-1 de 7745pb y *contig*-NDM-1 de 1952pb) los cuales fueron alineados frente a la base de datos de DNA no redundante del NCBI, donde se observa que alinearon con fragmentos de transposasas como *InsA* y *TnpA*, y un fragmento del gen *bla_{NDM-1}* de un plásmido JN967644 de *Escherichia coli* (Rasheed et al., 2013) (Tabla 3.6). Cabe señalar que las trasposasas hacen parte de transposones que si bien pueden ser encontradas en cromosomas, también pueden estar presentes en plásmidos catalizando el movimiento del tranposón de un lugar a otro dentro del genoma (Curtis and Schnek, 2008).

	Tamaños	Id Aislamientos	Proteína
<i>contigs</i>-NDM compartidos	9192-NDM	GMR-RA14, GMR-RA278, GMR-RA951, GMR-RA1152	<i>InsA</i>
	19204 -NDM	GMR-RA15, GMR-RA43, GMR-RA180, GMR-RA181, GMR-RA454, GMR-RA1080, GMR-RA22216, GMR-RA44516	<i>TnpA</i>
	19201-MDM	GMR-RA555, GMR-RA1048, GMR-RA7716	<i>TnpA</i>
	7745-NDM	GMR-RA767, GMR-RA649	<i>TnpA</i>
	1952-NDM	GMR-RA42816, GMR-RA46616	NDM-1
	5	19 / 28	

Tabla 3.6: *contigs*-NDM que presentan los mismos tamaños en pb con otros aislamientos *P. rettgeri*

Por otro lado, 1058 *contigs* no fueron clasificados como posibles secuencias plasmídicas de un total de 1626 *contigs* ensamblados y se distribuyen en promedio de 37 *contigs* no plasmídicos por aislamiento. Asimismo el número total de pares de bases constituyó el 94% del total de pares de bases ensambladas.

Teniendo en cuenta la limitación de la determinación del número de plásmidos por aislamiento que tienen los kits comerciales para extracción de megaplásmidos, debido a la presencia de diferentes estados conformacionales y su variación de migración, los datos obtenidos por este método no pueden considerarse de manera absoluta. Sin embargo PlasmidSPAdes ofrece una aproximación respecto al número de plásmidos presentes en un aislamiento, que puede ayudar en conjunto con los resultados de la extracción de DNA

plasmídico en términos de número de bandas observables (Tabla 3.7), para establecer el número de plásmidos presentes en cada aislamiento.

Aislado	N° plásmidos extracción	N° Plásmidos PlasmidSPAdes
GMR-RA14	4	2
GMR-RA15	2	3
GMR-RA43	1	3
GMR-RA180	4	1
GMR-RA181	1	2
GMR-RA218	1	3
GMR-RA257	3	2
GMR-RA278	1	1
GMR-RA437	1	1
GMR-RA454	3	3
GMR-RA555	1	1
GMR-RA649	1	2
GMR-RA767	1	2
GMR-RA951	1	3
GMR-RA953	2	2
GMR-RA1048	4	1
GMR-RA1080	1	2
GMR-RA1151	1	2
GMR-RA1152	1	1
GMR-RA1153	3	3
GMR-RA7716	1	2
GMR-RA13616	3	3
GMR-RA22216	1	2
GMR-RA38516	5	4
GMR-RA42816	3	3
GMR-RA43816	4	4
GMR-RA44516	1	2
GMR-RA46616	3	1

Tabla 3.7: Comparación del número de plásmidos obtenidos mediante la extracción y plásmidos determinados por PlasmidSPAdes

Finalmente, aunque este flujo de trabajo ofrece una buena solución para la identificación de secuencias plasmídicas empleando distintos enfoques bioinformáticos, es posible mejorar este *pipeline* incluyendo nuevos métodos que permitan optimizarlo; por ejemplo un enfoque interesante sería utilizar el algoritmo Expectation-Maximization (algoritmo EM) de (Kim et al. 2016; Trapnell et al. 2010) para la consolidación de la lista de los *contigs* seleccionados como plásmidos a partir de la probabilidad de que cada método utilizado los haya seleccionado correctamente.

3.3.3. Identificación de elementos plasmídicos mediadores de resistencia

Para los 568 *contigs* posiblemente asociados a plásmidos en los 28 aislamientos de *P.rettgeri*, 41 genes mediadores de resistencia diferentes fueron anotados mediante prokka v1.14.0, los cuales se ordenan en tres mecanismos de resistencia y se distribuyen de la siguiente manera: El 70,7% (n=29) de los genes encontrados tienen un mecanismo de resistencia degradando y/o la modificando el antibiótico (Tabla 3.9); el 19,5% (n=8) son genes que tienen un mecanismo de resistencia de cambio del sitio blanco (Tabla 3.8) y el 9,7% (n=4) son genes que se vincularon con bombas de Eflujo (Tabla 3.10).

De acuerdo a la clase de antibiótico, los genes más representativos son aquellos asociados con la resistencia a antibióticos aminoglucósidos el cual representa el 27,5% de los genes totales, seguido por los genes que median la resistencia a antibióticos β -lactámicos, que son el 19,6% de los genes totales, genes que median la resistencia a sulfonamidas, diaminopirimidinas y tetraciclinas que representan el 7,8% cada uno y genes de resistencia a fenoles, macrólidos y fluoroquinolonas, donde cada uno representa el 5,9% de los genes totales (Figura 3.5).

De igual forma, los genes asociados a la degradación y modificación del antibiótico se encontraron repartidos en el 100% (n=28) de los aislamientos, misma condición para los genes asociados con cambio en el sitio blanco. Por su parte, los genes asociados a bombas de eflujo se distribuyeron en el 75% (n=21) de los aislamientos.

Mecanismo de resistencia	%	Gen	Producto	Resistencia a clase de antibiótico
Cambio del sitio blanco	35,71	<i>QnrD1</i>	Proteína de resistencia	Fluoroquinolonas
	3,60	<i>QnrD2</i>		
	78,60	<i>sul1</i>	Dihidropteroato sintasa	Sulfonamidas
	39,30	<i>sul2</i>		
	57,14	<i>dfrA1</i>	Dihidrofolato reductasa	Diaminopirimidinas (Trimetropim)
	3,60	<i>dfrA12</i>		
	3,60	<i>dfrA19</i>		
3,60	<i>dfrA17</i>			

Tabla 3.8: Genes de resistencia asociados a cambios en el sitio blanco encontrados en *contigs* posiblemente asociados a plásmidos, en 28 aislamientos de *P. rettgeri*. %: porcentaje de aislamientos en los que se encuentra cada gen de resistencia encontrado.

Mecanismo de resistencia	%	Gen	Producto	Resistencia a
Degradación y modificación del antibiótico	10,71	<i>bla_{CTX-M-15}</i>	β -lactamasa de Espectro Extendido (BLEES)	Carbapenémicos Cefalosporinas (Cefamicinas) Penicilinas
	7,14	<i>bla_{CTX-M-12}</i>		
	60,71	<i>bla_{TEM-1}</i>		
	3,60	<i>bla_{PER-4}</i>		
	10,71	<i>bla_{VIM-2}</i>	Metallo β -lactamasa	
	7,14%	<i>bla_{VIM-24}</i>		
	96,42	<i>bla_{NDM-1}</i>	Metallo β -lactamasa	
	10,71	<i>bla_{CMY-2}</i>		
	7,14%	<i>bla_{OXA-1}</i>		
	14,30	<i>bla_{OXA-10}</i>		
	64,28	<i>aadA</i>	Nucleotidiltransferasa	
	3,60	<i>aadA2</i>		
	3,60	<i>aadA5</i>		
	7,14	<i>aadA15</i>		
	35,71	<i>aadA16</i>		
	14,30	<i>aadA23</i>		
	50	<i>AAC(3)-IIa</i>	Acetiltransferasa	Aminoglucósidos
	3,60	<i>AAC(6')-Ib7</i>		
	7,14	<i>AAC(6')-Ib-cr</i>	Nucleotidililación	
	17,60	<i>ANT(2'')-Ia</i>		
	42,60	<i>APH(3')-Ia</i>	Fosfotransferasa	
	7,14	<i>APH(3'')-Ib</i>		
	14,3	<i>APH(3')-VIa</i>		
	7,14	<i>APH(6)-Id</i>		
	3,60	<i>catI</i>	Acetiltransferasa	Fenoles
	53,60	<i>catII</i>		
3,60	<i>mphD</i>	Fosfotransferasa	Macrólidos	
10,71	<i>Mrrx</i>			
10,71	<i>mphA</i>			

Tabla 3.9: Genes de resistencia asociados a degradación y modificación del antibiótico encontrados en *contigs* posiblemente asociados a plásmidos, en 28 aislamientos de *P. rettgeri*. %: porcentaje de aislamientos en los que se encuentra cada gen de resistencia encontrado.

Mecanismo de resistencia	Familia	%	Gen	Bomba	Producto	Resistencia a
Bombas de Eflujo	Major Facilitator Superfamily (MFS) antibiotic efflux pump	57,14	<i>tetR</i>	tetR	Regulador	Tetraciclina
		14,30	<i>cmIA5</i>	cmIA5	Transportador	Fenicoles
		57,14	<i>tetA</i>	tet(A)	Transportador	Tetraciclina
		57,14	<i>tetD</i>	tet(D)	Transportador	Tetraciclina

Tabla 3.10: Genes de resistencia asociados a Bombas de Eflujo encontrados en *contigs* posiblemente asociados a plásmidos, en 28 aislamientos de *P. rettgeri*. %: porcentaje de aislamientos en los que se encuentra cada gen de resistencia encontrado.

3.3.4. *Perfiles de elementos genéticos plasmídicos asociados a la resistencia a antibióticos de 28 aislamientos de P. rettgeri*

Con el propósito de determinar los perfiles de elementos plasmídicos de resistencia a antibióticos asociados a cada grupo de aislamientos por departamento, se realizaron tres agrupaciones de acuerdo a los mecanismos de resistencia y el porcentaje de presencia de cada gen.

El grupo de los 21 aislamientos provenientes Bogotá contienen en el 95 % de sus aislamientos el gen *bla_{NDM-1}* la mayoría de ellos acompañado por el gen *bla_{TEM-1}*, asociados a la resistencia a β -lactámicos y tan solo el 19 %, 14 %, 14 %, 14 % y 9,5 % contienen los genes *bla_{OXA-10}*, *bla_{CTX-M15}*, *bla_{VIM-2}*, *bla_{CMY-2}* y *bla_{CTX-M12}* respectivamente. De igual forma estos aislados contienen genes asociados a la resistencia a antibióticos no β -lactámicos como *aadA*, *catII*, *AAC(3')-IIa* y *APH(3')-Ia* que se encuentran en el 76 %, 67 %, 57 % y 55 % de los aislamientos respectivamente. Asimismo, de acuerdo al perfil de resistencia plasmídico asociado a cambios en el sitio blanco, en la mayoría de estos aislamientos (81 % n=17 y 62 % n=13) se encontraron los genes de resistencia a sulfonamidas/diaminopirimidinas *sul1* y *dfrA1*, seguidos por otros genes *sul2*, *QnrD1* y *dfrA12* en el 28,5 %, 23 % y 5 % respectivamente. Además se identificaron los genes *tet(A)*, *tet(D)* y *tetR*, asociados a bombas de eflujo en el 67 % de estos aislamientos (Figura 3.3). Esto muestra la gran variabilidad que se encuentra en los perfiles plasmídicos de *P. rettgeri*, independientemente de las relaciones clonales entre ellos, lo cual fue posible gracias a la gran cantidad de aislamientos obtenidos en la ciudad de Bogotá, ya que es fácil evidenciar que a pesar de la cercanía genómica entre algunos de ellos, hay cambios en el perfil plasmídico, los cuales son mucho más grandes entre aislados no tan cercanos.

El segundo grupo de 3 aislamientos del departamento de Risaralda, muestra que todos tienen el gen *bla_{NDM-1}* en sus secuencias plasmídicas, y en dos de ellos (67 %) está acompañado por otros genes asociados al mecanismo de resistencia de degradación y modificación del antibiótico como *bla_{OXA-1}* y *bla_{VIM-2}*, también asociados a la resistencia a antibióticos β -lactámicos, y por los genes *AAC(6')-Ib cr*, y *ANT(2'')-Ia*, asociados a la resistencia a aminoglucósidos. De acuerdo al perfil de resistencia plasmídico asociado al mecanismo de resistencia de cambio en el sitio blanco, se observa que el 100 % de los aislamientos alberga el gen *QnrD1* de resistencia a fluoroquinolonas y dos de ellos (67 %) además tienen los genes de resistencia a sulfonamidas *sul1* y *sul2* (Figura 3.3).

De los departamentos que solo proveyeron un aislamiento multirresistente de *P. rettgeri*, solo los de Valle y Sucre presentan en sus secuencias plasmídicas genes asociados a los tres mecanismos de resistencia mencionados. Particularmente las secuencias plasmídicas de GMR-RA218 del Valle, presentan un perfil de resistencia asociado a degradación y modificación con la presencia

de los genes *bla_{NDM-1}* y *bla_{PER-4}*, asociados a la resistencia a antibióticos β-lactámicos, acompañados por los genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos *APH(3'')-Ib*, *APH(3')-VI*, *APH(6')-Id* y *mphD*, este último asociado a la resistencia a macrólidos. Por otro lado el perfil de resistencia asociado a cambio en el sitio blanco presenta los genes asociados a la resistencia a sulfonamidas *sul* y *sul2*, y el perfil asociado a la presencia de bombas de eflujo esta conformado por los genes asociados a la resistencia a tetraciclinas *tet(A)*, *tet(D)* y *tetR* (Figura 3.3). Las secuencias plasmídicas de GMR13616 de Sucre, presentan un perfil de resistencia asociado a la degradación y modificación de antibióticos con la presencia de los genes *bla_{NDM-1}* y *bla_{TEM-1}*, acompañados por otros genes como *aadA16*, *AAC(3')-IIa*, *APH(3'')-Ib*, *APH(6')-Id* y *catI*, este último asociado a la resistencia fenoles y solo encontrado en este aislamiento. En cuanto al perfil de resistencia al mecanismo de cambio en el sitio blanco, este aislamiento cuenta con los genes de resistencia a fluoroquinolonas y sulfonamidas/diaminopirimidinas *QnrD1*, *sul1*, *sul2* y *dfrA1*. También muestra tres genes asociados a la resistencia a tetraciclinas y a bombas de eflujo: *tet(A)*, *tet(D)* y *tetR* (Figura 3.3).

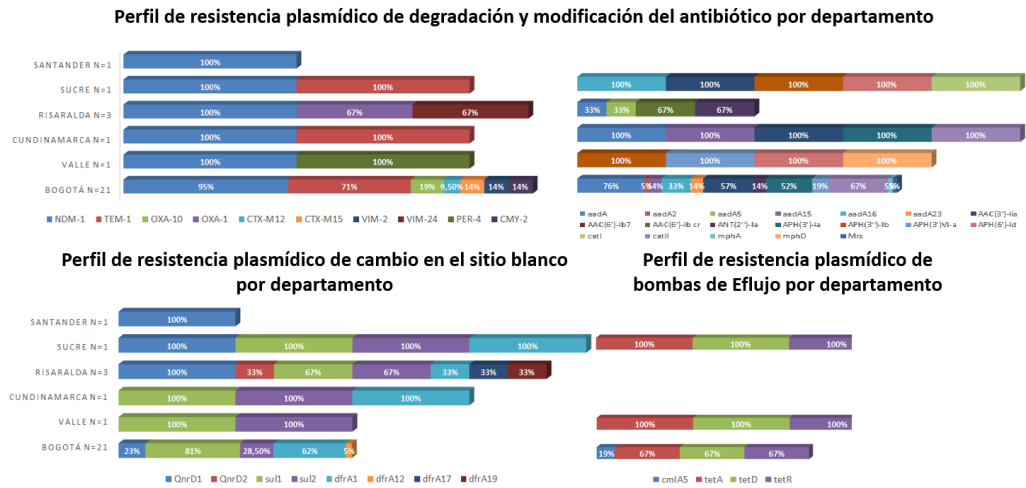


Figura 3.3: Perfil de resistencia plasmídico por departamento de 28 aislamientos *P. rettgeri*

Las secuencias plasmídicas de GMR-RA454 obtenida en Cundinamarca, al igual que el aislamiento de Sucre, presentan el mismo perfil de resistencia a modificación y degradación del antibiótico en cuanto a los genes asociados a la resistencia a antibióticos β-lactámicos presentes, sin embargo, se encuentran

acompañados por otros genes como *aadA*, *aadA15*, *AAC(3′)-IIa*, *APH(3′)-Ia*, y *catII*, mientras que su perfil de resistencia a cambios en el sitio blanco está dado por los genes *sul1*, *sul2* y *dfrA1* (Figura 3.3).

Finalmente las secuencias plasmídicas de GMR-RA43816 del departamento de Santander, muestran el perfil de resistencia asociado a secuencias plasmídicas menos complejo de los 28 aislamientos, donde solo se identificaron los genes *bla_{NDM-1}* y *QnrD1* (Figura 3.3).

Cabe señalar que de acuerdo a los datos de PlasmidSPAdes (Tabla 3.7), en promedio cada aislamiento alberga 2 plásmidos, además los aislamientos que albergan el gen *bla_{NDM-1}* muestran en promedio 12 genes de resistencia asociados al mismo, es decir que se encuentran dentro del mismo consolidado de *contigs* plasmídico en donde, como se observa en la Figura 3.4), 9 son los que se encuentran en mayor medida acompañando a dicho gen. Trabajos de revisión (Castañeda et al., 2016) reportan en promedio 3 genes de resistencia que acompañan a *bla_{NDM-1}* en plásmidos de cepas de *P. rettgeri* aisladas en diferentes países durante el 2016, sin embargo, aquí se encontraron en promedio de 12 genes; de igual forma se confirma que *bla_{NDM-1}* se encuentra generalmente asociado a otros genes de resistencia presentes en cassettes dentro de integrones clase I, como ya se mencionó anteriormente.

De acuerdo con la Figura 3.5, dentro del perfil de resistencia asociado a secuencias plasmídicas de los 28 aislamientos de estudio, los elementos con mayor predominancia son: *bla_{NDM-1}* (96,42%), seguido por *sul1* (78,60%), *aadA* (64,28%) y *bla_{TEM-1}* (60,71%), dos de ellos son mediadores de la resistencia a antibióticos β -lactámicos y que se encuentran categorizados en el grupo de genes degradadores y modificadores de antibióticos, uno es mediador de resistencia a sulfonamidas a partir de cambios en el sitio blanco y otro es mediador de resistencia a aminoglucósidos.

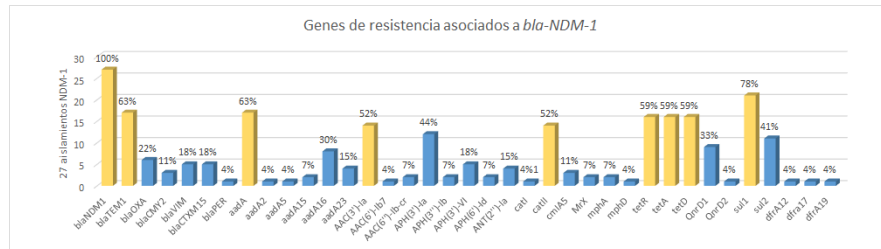


Figura 3.4: Genes de resistencia asociados a *bla_{NDM-1}*. En amarillo: Genes mediadores de resistencia mayormente asociados a *bla_{NDM-1}* de 27 aislamientos de estudio y en azul: Genes mediadores de resistencia que se encuentran en menor medida asociados a *bla_{NDM-1}* de 27 aislamientos de estudio. %: porcentaje de aislamientos en los que se encuentra cada gen de resistencia encontrado.

En la categoría de degradación y modificación de antibióticos, el gen *bla_{NDM-1}* fue el más representativo. Este codifica una enzima metalo- β -lactamasa (MBL) de clase B (Bush, 2013) conocida por conceder resistencia a casi todos los antibióticos β -lactámicos como penicilina, cefalosporinas y carbapenémicos (estos últimos a menudo utilizados como última opción terapéutica), con excepción de los monobactámicos como el aztreonam. Difiere de otras MBL en cuanto a su capacidad de asociarse a la membrana externa celular y claramente a su capacidad de diseminación dentro de las especies de bacterias Gram negativas (King and Strynadka 2011; Walsh et al. 2011); con frecuencia asociada a otros genes de resistencia de alta diseminación en plásmidos los cuales causan resistencias cruzadas, evidenciándose en un fenotipo panresistente (Kumarasamy et al., 2010) o causando cambios en la expresión y función de esta enzima (Toleman et al., 2012). Del mismo modo, NDM-1 ha sido vinculado a megaplásmidos o plásmidos conjugativos >40KB, y ya que estos son autotransferibles, pueden propagarse en diferentes células bacterianas independientemente de los clones de la cepa original, así NDM-1 ha sido encontrada en cepas de *P. rettgeri* (Mataseje et al. 2013; Marquez-Ortiz et al. 2017b; Marquez-Ortiz et al. 2017a) y en otras bacterias Gram negativas (Yong et al. 2009; Johnson and Woodford 2013).

En Colombia, fueron reportadas por primera vez 14 cepas de *P. rettgeri* portadoras de *bla_{NDM-1}* circulantes en dos departamentos: Santander y Cundinamarca durante el 2012 y 2013, presentando un fenotipo multirresistente (Rojas et al., 2017). De igual forma en esos años ya se conocía el incremento de la presencia del gen en otros aislamientos, lo que aún genera preocupación debido al uso limitado de opciones terapéuticas, sobre todo si antibióticos como la colistina resultan ser ineficaces en especies naturalmente resistentes como lo es *P. rettgeri*. El presente estudio, ratifica la alta diseminación de este gen, ya que fue encontrado en 27 aislamientos de *P. rettgeri*.

Aparte de *bla_{NDM-1}*, otros genes encontrados que codifican β -lactamasas de clase B fueron *bla_{VIM-2}* y *bla_{VIM-24}*. VIM-2 es a menudo reportada en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* causando infecciones intrahospitalarias (Hong et al. 2018; Voor et al. 2018), mientras VIM-24 fue por primer vez detectada en una cepa de *K. pneumoniae* en Colombia (Montealegre et al., 2011). Ambas están asociadas a la resistencia a carbapenpémicos y tienen una identidad de solo el 32,4% respecto a NDM-1 (Yong et al., 2009).

Igualmente la presencia de genes que codifican β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEES) se distribuyeron de la siguiente manera: del grupo A según la clasificación Ambler, los genes *bla_{TEM-1}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{CTX-M-12}* y *bla_{PER-4}* se encontraron en el 60,71% (n=17), 10,71% (n=3), 7,14% (n=2) y 3,6% (n=1) de los aislamientos respectivamente (Figura 3.5). Los datos aquí presentados coinciden con el porcentaje de presencia de los genes *bla_{TEM-1}* y *bla_{PER-4}* del estudio preliminar del genoma completo de los 28 aislamientos, evidenciando que estos están asociados a *contigs* posiblemente plasmídicos de las 28 cepas de *P. rettgeri*. Asimismo genes que codifican β -lactamasas de tipo TEM, CMY, CTX y OXA se han reportado

en otras cepas como: *P. rettgeri 58k* aislada de catéter (Aibinu et al., 2011), *P. rettgeri IOMTU1*, *P. rettgeri IOMTU4*, *P. rettgeri IOMTU91*, *P. rettgeri IOMTU94* y *P. rettgeri IOMTU99* reportadas por (Tada et al., 2014), y en *P. rettgeri* colombianas (Marquez-Ortiz et al. 2017a; Rojas et al. 2017). El gen *bla_{TEM-1}* es uno de los más frecuentes en la familia de los *Enterobacteriaceae* (Lachmayr et al., 2009), ofreciendo resistencia a inhibidores clásicos de β -lactamasas, como tazobactam cuando se encuentra sobre expresado (Wu et al. 1995; Schechter et al. 2018). Por otro lado el gen *bla_{PER-4}*, confiere resistencia a cefalosporinas de tercera generación, fue por primera vez reportado en una cepa de *Proteus vulgaris* (NG_049963) y solo se ha reportado una variante de este gen (*bla_{PER-1}*) en *P. rettgeri* (Shin et al. 2018; Bahar et al. 2004).

En cuanto a los genes *bla_{CTX-M-15}* y *bla_{CTX-M-12}*, se sabe que están asociados a plásmidos autotransferibles, que se encuentran ampliamente diseminados en varias especies de bacterias Gram negativas y que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación. Una de las variantes más comunes de β -lactamasas es CTX-M-15 (Zhao and Hu, 2013) que muestra eficiencias catalíticas frente a ceftazidima (Poirel et al., 2002), mientras que CTX-M-12 confiere resistencia principalmente a cefotaxima y se encuentran estrechamente relacionada a cepas de *K. pneumoniae* y *Escherichia coli* (Kariuki et al. 2001; Bae et al. 2006).

Por otro lado, la enzimas BLEES CMY-2 que pertenece a la clase C de la clasificación Ambler es codificada por el gen AmpC de plásmidos *bla_{CMY-2}* y que confiere resistencia a cefotaxima, un β -lactámico de segunda generación (Philippon et al., 2002), se encontró en secuencias posiblemente asociadas a plásmidos de tres de los 28 aislamientos de *P. rettgeri* estudiados; lo que ayuda a explicar la resistencia de estos tres aislamientos a cefotaxima reportada previamente en el estudio preliminar del genoma completo de estos aislamientos.

Asimismo dos genes de la clase D fueron identificados en estos *contigs*: *bla_{OXA-1}* y *bla_{OXA-10}*. La enzima OXA-1 generalmente se encuentra asociada a la resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas, aunque son sensibles a inhibidores clásicos de β -lactamasas como el ácido clavulánico y han sido reportadas en mayor medida en cepas de *E. coli* aisladas tanto de humanos como de animales (Briñas et al., 2002) y disminuyen levemente la sensibilidad a piperaciclina-tazobactam, ampicilina sulbactam y en menor medida a cefepime (Navarro et al., 2011). Por otro lado, OXA-10 frecuentemente está relacionada con cepas de *P. aeruginosa* (Antunes and Fisher, 2014), también se ha encontrado en cepas de *Porvidencia* (Aibinu et al., 2011), presentado resistencia leve a carbapenémicos. Estos genes se han encontrado generalmente dentro de un integrón de clase I asociado a transposones (Aubert et al., 2001). En este estudio fueron anotados *bla_{OXA-1}* y *bla_{OXA-10}* en secuencias posiblemente asociadas a plásmidos de los 28 aislamientos *P. rettgeri* coincidiendo con plásmidos reportados en cepas *P. rettgeri 58k* aislada de catéter (Aibinu et al., 2011), *P. rettgeri IOMTU1*, *P.*

rettgeri IOMTU4, *P. rettgeri* IOMTU91, *P. rettgeri* IOMTU94 y *P. rettgeri* IOMTU99 reportadas por (Tada et al., 2014), que también albergan ese gen.

De igual forma en el análisis de los consolidados plasmídicos de los 27 aislamientos que albergaban el gen *bla_{N_{DM}-1}*, se encontró que en el 100 % de los casos dicho gen se encontraba acompañado de otros genes β -láctamicos y no β -láctamicos asociados a plásmidos como ya se ha reportado anteriormente en *P. rettgeri* (Aibinu et al. 2011; Tada et al. 2014; Marquez-Ortiz et al. 2017a). De estos fueron encontrados con mayor frecuencia *sul1* en 21 aislamientos (78 %), *bla_{TEM}-1* y *aadA* en 17 aislamientos (63 %), *tetR*, *tet(A)* y *tet(D)* en 16 aislamientos (59 %), *AAC(3')-Ia* y *catIII* en 14 aislamientos (52 %) (Figura 3.4).

Por otra parte, otros genes que median la resistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos, fenoles, sulfonamidas y diaminopirimidinas, conforman el 55 % del resistoma total anotado en los *contigs* posiblemente asociados a plásmidos de los 28 aislamientos de *P. rettgeri* estudiados. En cuanto a los genes mediadores de la resistencia a aminoglucósidos los más representativos fueron: *aadA* con el 64,28 %, *AAC(3')-IIa* con el 50 %, *APH(3')-Ia* con el 42,6 % y *aadA16* con el 35,71 %; de igual modo *catIII* fue el gen con mayor presencia de los genes mediadores de resistencia a fenoles con el 53,6 %; en cuanto a resistencia a los macrólidos, dos genes se encontraron en la misma medida *Mrx* y *mphA* con el 10,71 %; con relación a resistencia a las tetraciclinas, los genes *tet(A)*, *tet(D)* y *tetR* se encontraron en el 57,17 % de los aislamientos, cada uno; de los genes resistentes a fluoroquinolonas, la variante *QnrD1* se encontró en el 35,71 % de los aislados, mientras que el gen medidor de resistencia a sulfonamidas más representativo fue *sul1* identificado en el 78,6 % de los aislados y el de los genes mediadores de resistencia a diaminopirimidinas fue *dfrA* presente en el 57,14 % de los aislados (Figura 3.5).

Los genes anteriormente mencionados a menudo se encuentran asociados a integrones, generalmente de clase 1, que contienen una gran variedad de genes de resistencia. Ya sean genes β -láctamicos o genes que median la resistencia a trimetropin, sulfonamidas, fenoles, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina y quinolonas, uno o varios genes representantes pueden estar albergados en un solo cassette de resistencia (secuencia variable dentro de un integrón) (Rechia and Sherratt 2002; White et al. 2001; Tran and Jacoby 2002). Estudios como los de (Johnson and Woodford 2013; Marquez-Ortiz et al. 2017b; Tada et al. 2014; Olaitan et al. 2015; Aibinu et al. 2011) evidencian la presencia de estos cassettes en cepas de *P. rettgeri* asociadas en gran medida a plásmidos; así mismo exponen variables de estas secuencias cassttes como es el caso de los plásmidos de *P. rettgeri*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii* reportados por (Marquez-Ortiz et al., 2017a), en donde el común denominador es la presencia del gen *bla_{N_{DM}-1}*.

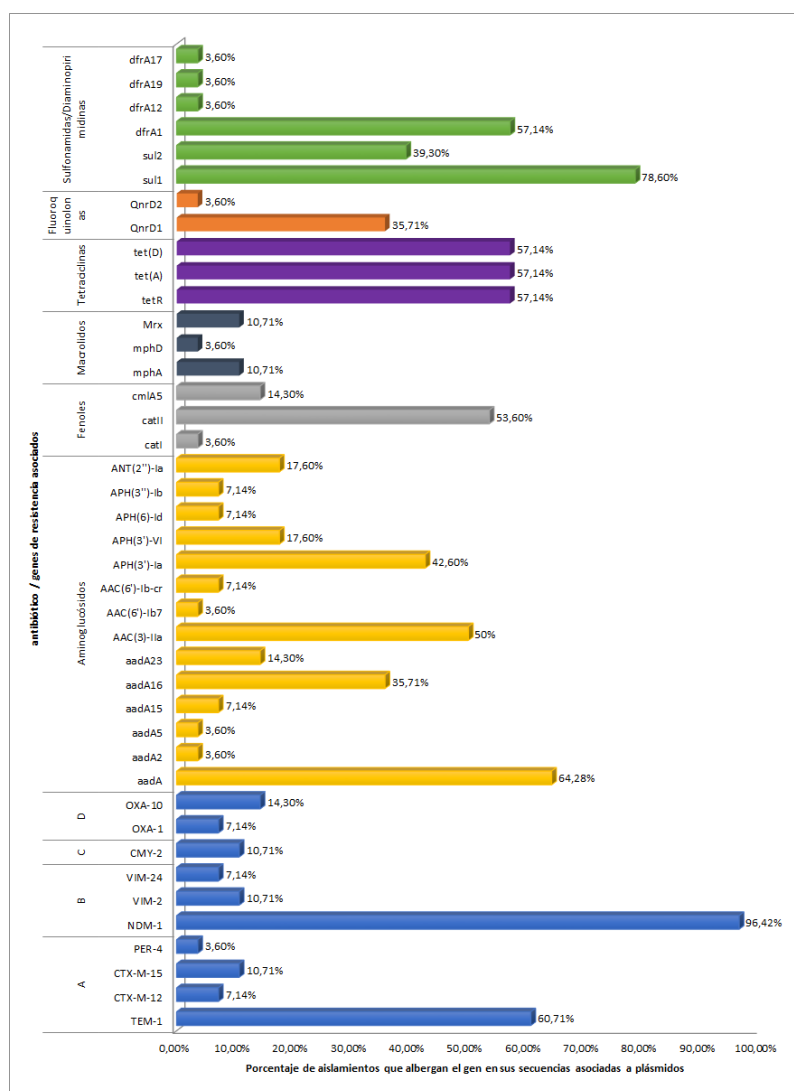


Figura 3.5: Perfil plasmídico de genes asociados a la resistencia a distintas familia de antibióticos de 28 aislamientos *P. rettgeri*. En verde: Genes mediadores de resistencia a sulfonamidas y diaminopirimidinas; en naranja: Genes mediadores de resistencia a fluoroquinolonas; en morado: Genes mediadores de resistencia a tetraciclinas; en negro: Genes mediadores a la resistencia a macrólidos; en gris: genes mediadores a la resistencia a fenoles; en amarillo: Genes mediadores de resistencia a aminoglucósidos y en azul: Genes mediadores a la resistencia a antibióticos β -lactámicos. %: porcentaje de aislamientos en los que se encuentra cada gen de resistencia encontrado.

En conclusión, lo anterior sugiere la gran facilidad que tiene *P. rettgeri* para acumular genes de resistencia a través de la incorporación de plásmidos por intercambio con otras *P. rettgeri* u otras bacterias gracias a la transferencia horizontal de genes (Aibinu et al. 2011; Marquez-Ortiz et al. 2017a; Tada et al. 2014), que hace que estas secuencias se re arreglen hasta el punto de no compartir un ancestro en común (Marquez-Ortiz et al., 2017a), ya que aunque comparten algunos genes no comparten el mismo ambiente genético. De igual forma, la capacidad que tienen las bacterias Gram negativas de captar fácilmente este tipo de moléculas (Plásmidos), le permite adquirir distintos mecanismos de resistencia a distintos antimicrobianos exhibiendo un fenotipo multirresistente. Esto parece ser plausible en las cepas de *P. rettgeri* de estudio dado al número de genes de resistencia encontrados en secuencias asociadas a plásmidos que hace esta especie potencialmente peligrosa.

Capítulo 4

Determinación de las relaciones genéticas entre los perfiles plasmídicos obtenidos y los de otras cepas de *P. rettgeri* previamente reportadas

4.1. Introducción

El rápido desarrollo de tecnologías de secuenciación masiva, el bajo costo y corto tiempo que implica la obtención y el uso de secuencias genómicas, han proporcionado una vasta información sobre diversos organismos y aumenta la posibilidad de llenar algunos vacíos sobre la variabilidad genética, evolución y las relaciones entre bacterias (Gupta, 2016). De igual forma, el uso de esta información permite postular métodos para analizar estas secuencias y resolver hipótesis sobre características genéticas conservadas o no conservadas (Chun and Rainey, 2014). Una de estas metodologías es la determinación de distancias filogenéticas a partir de alineamientos blast, para inferir una relación filogenética entre dos a mas secuencias (Henz et al., 2005).

Asimismo, la obtención de secuencias genómicas y la determinación de distancias filogenéticas pueden llevar al entendimiento de particularidades biológicas distintivas a nivel taxonómico o a nivel de una célula (cromosomas y plásmidos) (Gupta, 2016). Así, el uso de secuencias genéticas conservadas para la determinación de distancias filogenéticas, es de utilidad a la hora de determinar si la ocurrencia de estas secuencias está dada por cambios en el taxón o por transferencia horizontal de genes (Gupta, 2016). De acuerdo a esto, algunos estudios sugieren que la ocurrencia de ciertas secuencias durante la transferencia horizontal de genes, puede estar mínimamente involucrada en las relaciones evolutivas a nivel taxonómico. No obstante, queda por determinar qué impacto tiene este mecanismo en la evolución y clasificación bacteriana (Gupta, 2016).

Por lo anterior, en el presente estudio se planteó determinar las relaciones entre las secuencias plasmídicas previamente anotadas y el conjunto de genes asociados a resistencia antimicrobiana presentes en los 28 aislamientos clínicos de *Providencia rettgeri* estudiados en el presente trabajo.

4.2. Metodología

4.2.1. *Determinación de relaciones entre los perfiles plasmídicos*

Con el objetivo de establecer las relaciones entre los perfiles plasmídicos de los 28 aislamientos de estudio, se anotaron los *contigs* identificados como posiblemente plasmídicos utilizando los archivos de anotación .gff de Prokka v1.14.0. Los pangenomas fueron obtenidos utilizando Roary v3.7.0 (Page et al., 2015), herramienta que produjo una matriz de presencia/ausencia de genes .csv y un archivo de alineación de genes multi-FASTA .newick, y a partir de estos se infirió un árbol de los perfiles plasmídicos utilizando la herramienta web llamada Phandango (Hadfield et al., 2018).

4.2.2. *Determinación de los elementos genómicos de resistencia presentes en los perfiles plasmídicos*

La determinación de los elementos genómicos de resistencia presentes en los perfiles plasmídicos de los aislamientos de *P. rettgeri*, fue realizada utilizando el software RGI (Identificador de Genes de Resistencia), a partir de las secuencias nucleotídicas de los *contigs* identificados como posibles plásmidos de cada aislamiento. Este software vinculado a la base de datos integral de resistencia a antibióticos CARD (Alcock et al., 2019), generó un archivo de resultados (.json) con la lista de elementos de resistencia presentes en el perfil plasmídico de cada aislamiento y con ellos, utilizando la opción *heatmap* del programa RGI, se obtuvo el mapa de calor que permitió comparar los elementos de resistencia presentes en los plásmidos de los diferentes aislamientos.

4.2.3. *Análisis comparativo de contigs asociados a plásmidos y secuencias de referencia de plásmidos reportados en Providencia rettgeri*

Para realizar el análisis comparativo de los *contigs* asociados a plásmidos inferidos empleando el *pipeline*, se descargaron de la base de datos Genome del NCBI once secuencias de plásmidos reportados de *P. rettgeri*: R7K (Revilla et al., 2008), AR_0082 (Tatusova et al., 2014), pDIJ09-518a, pGHS09-09a (Guillard et al., 2012), pPRET1 (Galac and Lazzaro, 2012), pPrY2001 (Mataseje et al., 2013), p16Pre36-1, p16Pre36-NDM, p06-1619-1, p06-1619-NDM

(Marquez-Ortiz et al., 2017a) y pRB151-NDM (Marquez-Ortiz et al., 2017b). Estas secuencias fueron anotadas usando Prokka v1.14.0 y comparadas mediante Roary v3.7.0 (Page et al., 2015). Los resultados fueron visualizados a través de Phandango (Hadfield et al., 2018).

4.2.4. *Asignación de posibles familias de Incompatibilidad a consolidados de contigs de P. rettgeri obtenidas del pipeline*

Para una definición aproximada del consolidado de *contigs* posiblemente plasmídicos, se empleó la herramienta Plasmid Multilocus sequence Type (pMLST) descrita por (Carattoli et al., 2014), disponible en el sitio web (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/pMLST>). Esta herramienta contiene una colección de datos alélicos y perfiles ST de plásmidos esquematizados por grupos de incompatibilidad, que permite asignar o tipificar una secuencia plasmídica.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. *Análisis comparativo entre secuencias asociadas a plásmidos de los 28 aislamientos de P. rettgeri*

Con el objetivo de realizar un análisis comparativo entre los *contigs* de estudio, se realizó un cálculo de las distancias entre los perfiles plasmídicos de los aislamientos de estudio mediante Roary y se infirió el árbol correspondiente.

Roary calculó el número de *core genes* (genes núcleo), *softcore genes* (genes blandos), *shell genes* y *cloud genes*. Para el primero Roary no encontró ningún *core gene*, solo 3 *softcore genes* fueron encontrados, mientras que 590 *shell genes* y 2140 *cloud genes* estaban presentes, para un total de 2733 proteínas. Los *softcore genes* comprendieron el 0,1%, los *shell genes* el 21,5% y los *cloud genes* el 78% en promedio por cada grupo de *contigs*.

Los *core genes* hacen referencia a los genes principales que los genomas bacterianos tienen en común y que son indispensables para una especie bacteriana determinada, los *softcore genes* hacen referencia a un porcentaje de genes que comprende entre el 95% - 99% de genes compartidos entre los genomas bacterianos, mientras los *shell* y *cloud genes* son genes menos comunes o compartidos entre los genomas bacterianos: 15% - 95% y 0% - 15% respectivamente. En este caso el resultado indica que estas secuencias

varían, puesto que la proporción de *core genes* es muy pequeña en comparación con los otros genes, lo que indica una alta variabilidad en la composición plasmídica de los aislados.

De acuerdo al árbol Roary (Figura 4.1), hay tres clados principales: el clado A conformado por las secuencias plasmídicas del aislamiento GMR-RA14_P, el clado B donde se presentan dos subclados bien definidos: En el primero donde las secuencias plasmídicas de GMR-RA42816_P y GMR-RA46616_P se agrupan a una muy pequeña distancia, y que de acuerdo con los datos socio-demográficos para el año 2016 se encontraban circulando en el mismo departamento (Risaralda), en el mismo hospital (H16) y además pertenecen a dos aislados que fueron tipificados como rST86903 reportado en "Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri* durante el periodo 2015-2016", lo que puede indicar una relación clonal entre los dos aislamientos, aunque ya presentaban una pequeña distancia en los perfiles plasmídicos. Y en el segundo subclado se puede observar las secuencias plasmídicas de GMR-RA1153_P y GMR-RA257_P los cuales fueron recolectados en el año 2015 en el mismo hospital (H11) de la ciudad de Bogotá. De igual forma, los aislados fueron tipificados con el mismo rST61696, en el estudio anteriormente mencionado.

No obstante, en el clado B también se observan dos subclados adicionales que, a diferencia de los mencionados, sus perfiles plasmídicos no tienen una distancia tan cercana: El primero de ellos conformado por los perfiles plasmídicos de los aislamientos GMR-RA1151_P, GMR-RA1153_P, GMR-RA257_P y GMR-RA38516_P, aislados que se encontraban circulando en un mismo hospital (H11) de Bogotá durante los años 2015 y 2016. Y un segundo subclado integrado por los perfiles plasmídicos de los aislamientos GMR-RA42816_P, GMR-RA46616_P y GMR-RA767_P, aislados en el mismo hospital (H16) del departamento de Risaralda, durante los años 2015 y 2016. Cabe mencionar la cercanía que se observa entre GMR-RA649_P y GMR-RA767_P, que aunque pertenecen a dos aislados con el mismo rST89602, se presentaron en dos hospitales distintos (H9 y H16 respectivamente) y en dos departamentos diferentes (Bogotá y Risaralda respectivamente), durante el 2015 (Anexo B).

Por otra parte el clado C (Figura 4.1), que comprende las secuencias plasmídicas de los aislamientos GMR-RA1152_P a las secuencias plasmídicas de GMR-RA278_P, muestra un grupo de perfiles plasmídicos con mucha más variación entre ellos, a pesar que muchos de los aislamientos fueron obtenidos en el mismo sitio y en el mismo año, como es el caso de GMR-RA278_P, GMR-RA951_P y GMR-RA180_P, los cuales circulaban en el hospital H1 de la ciudad de Bogotá durante el año 2015; los aislamientos GMR-RA22216_P y GMR-RA7716_P, obtenidos en el hospital H2 de Bogotá durante el año 2016; y de los aislamientos GMR-RA1048_P y GMR-RA555_P, que circularon en el hospital H3 de Bogotá durante el año 2015. Asimismo, los aislamientos que pertenecen al clado C, mayoritariamente fueron reportados en Bogotá en el año 2015.

La capacidad de *P. rettgeri* para variar su perfil plasmídico es grande como se puede deducir por la circulación de las cepas en los mismos hospitales y en el mismo año con perfiles plasmídicos diferentes como es el caso de GMR-RA15_P y GMR-RA437_P, aislados en el hospital H6 durante el año 2015 en Bogotá; GMR-RA649_P y GMR-RA181_P, obtenidos en el 2015 en el hospital H9 de Bogotá y GMR-RA278_P, GMR-RA951_P, GMR-RA180_P y GMR-RA44516_P, aislados en el hospital H1 en Bogotá durante los años 2015 y 2016 respectivamente.

En conclusión estos resultados muestran que cuando se observan posibles relaciones clonales de los perfiles plasmídicos, no se evidencia algún patrón conservado en las secuencias plasmídicas de *P. rettgeri*, lo que indica la facilidad con que esta bacteria intercambia estos elementos móviles y por ende existe una gran variedad en los que se incorporan a esta bacteria.

Por otro lado la comparación del árbol de los perfiles plasmídicos con el inferido con los resultados de la extracción de plásmidos (Figura 4.2), muestra que las agrupaciones no se conservan respecto al árbol obtenido por Roary (Figura 4.2-B) ya que los aislamientos que conforman los clados A, B y C (Figura 4.2-A), se encuentran dispersos en los diferentes clados que conforman el árbol Roary. Sin embargo existen cuatro agrupamientos que se conservan en ambos árboles: GMR-RA42816 y GMR-RA46616; GMR-RA1153 y GMR-RA257; GMR-RA649 y GMR-RA767 y GMR-RA7716 y GMR-RA555, y aunque los últimos dos agrupamientos presentan pequeñas variaciones que hacen que estén a una pequeña distancia en el árbol de perfiles plasmídicos (Figura 4.2-B), estos agrupamientos pueden ser debido a relaciones clonales, ya que su agrupamiento coincide con los obtenidos en el árbol de pangenomas de las 28 cepas (Figura 4.3, cuadros rosa).

Asimismo, cuando se compara el árbol de los pangenomas de los 28 aislamientos de *P. rettgeri* (Figura 4.3) con los perfiles plasmídicos (Figura 4.1), es evidente que las cepas de *P. rettgeri* tienden a incorporar plásmidos del medio donde crecen, ya que los agrupamientos en los dos árboles son en general diferentes mostrando independencia entre el contenido de plásmidos (Figura 4.1) y las relaciones de clonalidad implícitamente representadas en el árbol de pangenomas (Figura 4.3). Desde luego como ya se había mencionado, cuando las cepas posiblemente tienen una relación clonal cercana, los agrupamientos entre ellas son consistentes en los dos árboles.



Figura 4.1: Árbol de perfiles plasmídicos de 28 aislamientos colombianos de *P. rettgeri*

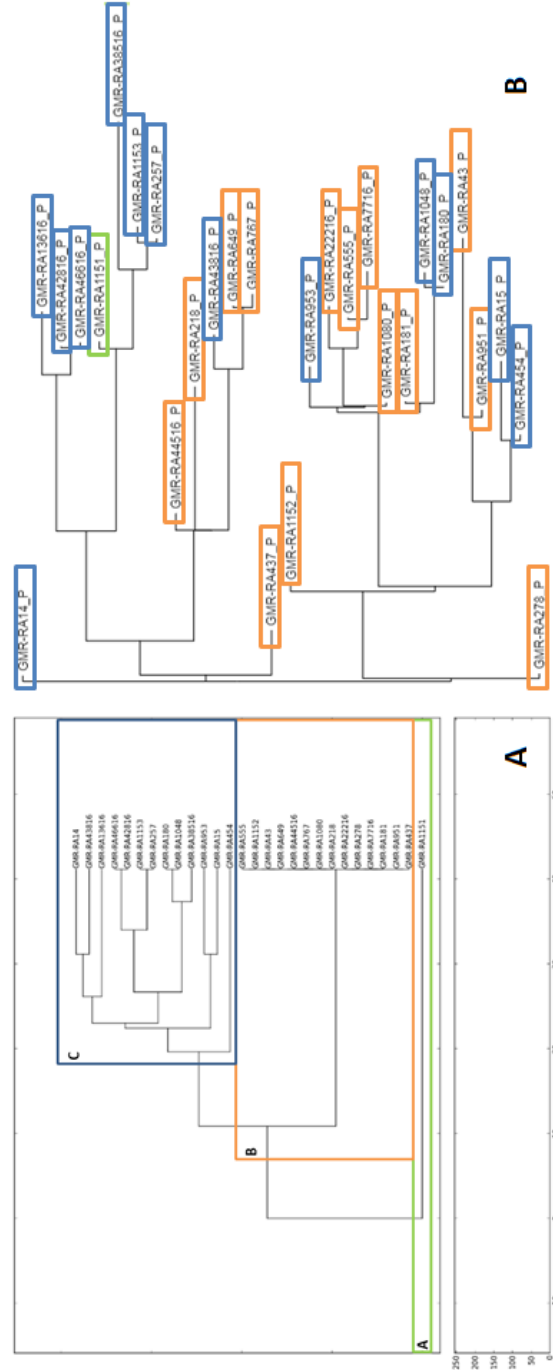


Figura 4.2: Comparación del árbol de perfiles plasmídicos de *P. rettgeri* y el dendrograma realizado a partir de extracciones de plásmidos de los 28 aislamientos de *P. rettgeri*. A: Dendrograma inferido por el patrón de bandas observadas en la electroforesis, donde se observan 3 grupos representados por las letras A (cuadro verde), B (cuadro naranja) y C (cuadro azul). B: Árbol inferido por Roary, donde los cuadros azules, naranjas y verde, refieren los consolidados de *contigs* posiblemente plasmídicos versus los agrupamientos inferidos por los patrones de bandas.

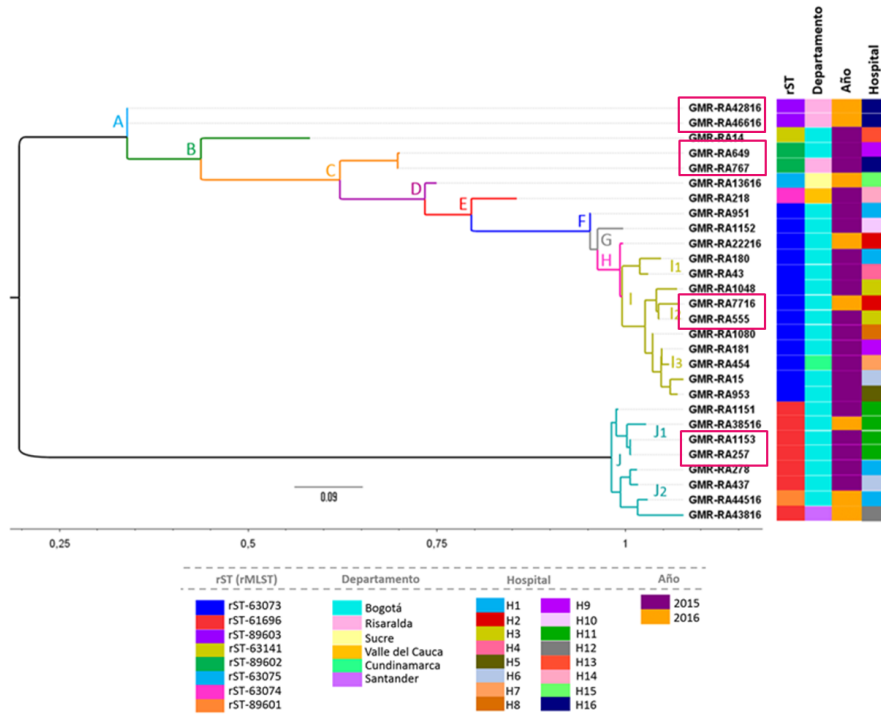


Figura 4.3: Árbol filogenético de genomas colombianos de *P. rettgeri*. Tomado y modificado de: "Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia de antibióticos β -lactámicos de *Providencia rettgeri* durante el periodo 2015-2016"

Estos resultados indican una alta divergencia de secuencias posiblemente plasmídicas de los 28 aislamientos colombianos de *P. rettgeri*, debido a la amplia distribución que se observa en la Figura 4.1, además de la existencia de aislamientos que no se agrupan de la misma manera que en el árbol de los pangenomas (Figuras 4.1 y 4.3). Una de las variaciones de agrupamiento más evidentes fue la generada por las secuencias plasmídicas GMR-RA278_P y GMR-RA437_P, que a pesar de ser parte de dos aislados con el mismo rST, haber sido aisladas en el mismo año en Bogotá y agruparse muy cercanamente el árbol de pangenomas (Figura 4.3) resultan diferir en su ubicación el árbol de perfiles plasmídicos, debido a que representan variaciones en las secuencias o en el contenido de los plásmidos entre aislamientos.

Estos datos muestran que las cercanías entre secuencias plasmídicas dadas por Roary, tienen un mayor poder de resolución frente a las agrupaciones mostradas por el dendrograma, basadas en las extracciones de plásmidos (Figura 4.2-A), ya que con las extracciones plasmídicas solo se obtienen agrupaciones de las que no se pueden inferir si, adicionalmente al tamaño de los plásmi-

dos, su cercanía se debe a la conservación de la secuencia y por ende de su ambiente genómico.

4.3.2. *Análisis y comparación de los perfiles de resistencia plasmídicos de 28 aislamientos de P. rettgeri*

El perfil de genes asociados a la resistencia a antimicrobianos, en las posibles secuencias plasmídicas determinadas por el *pipeline* se observa en la Figura 4.4. En esta se puede apreciar cuatro tendencias en el contenido de genes RAM (Resistencia a Antimicrobianos) en los clados A y B de consolidados posiblemente plasmídicos, que va de **GMR-RA14_P** (Clado A) y desde **GMR-RA13616_P** a **GMR-RA437_P** (Clado B): la primera de ellas, hacia el gen de resistencia a antibióticos β -lactámicos *bla_{NDM-1}*; la segunda, hacia el gen de resistencia a aminoglucósidos *aadA*; la tercera, hacia el gen de resistencia a fluoroquinolonas *QnrD1*; y la cuarta, hacia los genes de resistencia a sulfonamidas *sul1* y *sul2*.

Por su parte, seis tendencias que comienzan a perfilar el contenido de genes RAM, en el clado C de los consolidados que va de **GMR-RA1152_P** a **GMR-RA278_P**, se presenta de la siguiente manera: la primera de ellas es hacia los genes de resistencia a β -lactámicos *bla_{NDM-1}* y *bla_{TEM-1}*; la segunda, hacia los genes de resistencia a aminoglucósidos *aadA*, *AAC(3')IIa* y *APH(3')-VI*; la tercera hacia el gen de resistencia a fenoles *catII*; la cuarta, hacia los tres genes de resistencia a tetraciclinas *tet(A)*, *tet(D)* y *tetR*; la quinta, hacia el gen de resistencia a sulfonamidas *sul1*; y la sexta hacia el gen de resistencia a diaminopirimidinas *dfrA1*.

En términos generales, el consolidado de secuencias plasmídicas del clado C tiene un perfil más resistente, con mayor presencia de genes asociados a la resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos y tetraciclinas, por consolidado plasmídico, en comparación con el perfil de resistencia de los clados A y B, ya que aunque existe mayor número de genes asociados a la resistencia a β -lactámicos, estos están presentes en un menor número de los consolidados (**GMR-RA1151_P**, **GMR-RA38516_P**, **GMR-RA1153_P** y **GMR-RA257_P**) y en cuanto a los demás genes de resistencia a otros grupos de antibióticos, se encuentran mucho más dispersos a excepción de los genes asociados a la resistencia a fluoroquinolonas y sulfonamidas. Sin embargo para tener información más específica sobre estos consolidados, es necesario analizarlos uno a uno, comenzado por aquellos que presentan mayor similitud, los cuales se describirán en los siguientes párrafos.

GMR-RA42816_P y **GMR-RA46616_P** muestran un perfil de resistencia similar, dado que ambas comparten en primer lugar tres genes de resistencia a β -lactámicos: *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-1}* y *bla_{VIM-24}*, los dos últimos presentes sólo en estas secuencias; en segundo lugar dos genes de resistencia

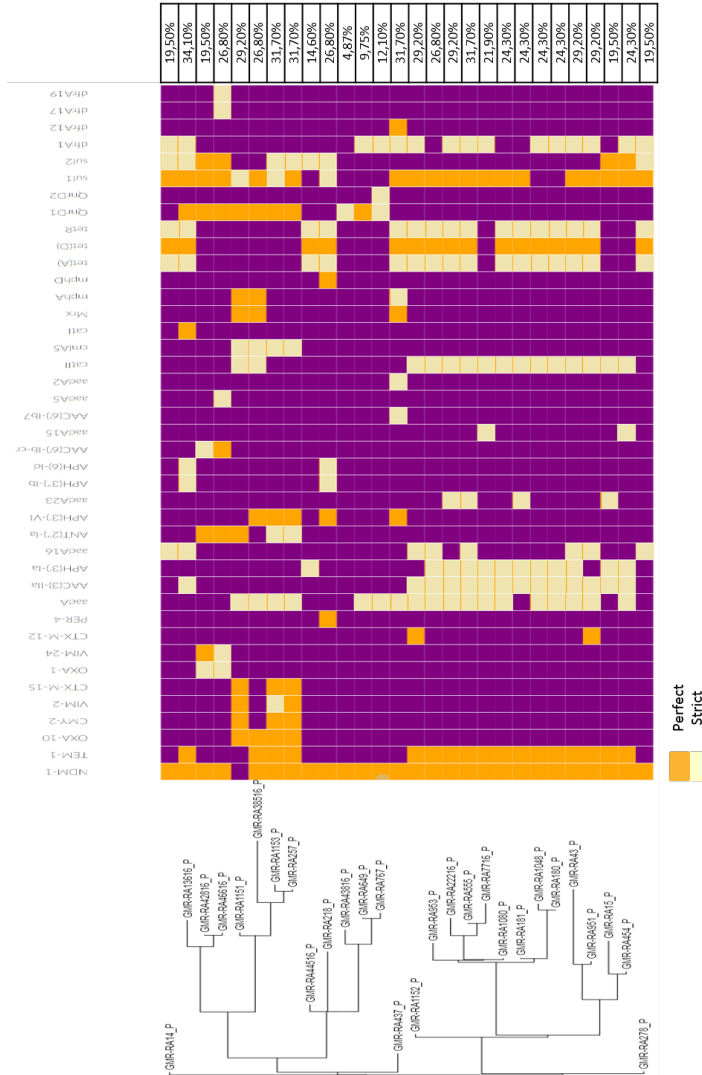


Figura 4.4: Perfil genético de resistencia asociado a secuencias plasmídicas de *P. rettgeri*. *Heatmap* donde los genes calificados como "Perfect" son aquellos que superan un *bit score* calculado por RGI y tienen un porcentaje de identidad de 100%, se encuentran de color amarillo. Los genes calificados como "Strict" son aquellos que superan el *bit score*, pero que tienen un porcentaje de identidad menor 100%, se encuentran en color blanco. %: porcentaje de genes asociados a la resistencia a antimicrobianos presentes en el perfil plasmídico. El color morado indica la ausencia de genes.

a aminoglucósidos: *ANT(2'')-Ia* y *AAC(6')Ib-cr*, este último presente solo en estos dos consolidados; en tercer lugar un gen asociado a la resistencia fluoroquinolonas: *QnrD1*; y por último dos genes de resistencia a sulfonamidas: *sul1* y *sul2*. Adicionalmente GMR-RA46616_P presenta tres genes más: *dfrA17*, *dfrA19* y *aadA5*, lo cuales no son compartidos con ninguna secuencia plasmídica.

Teniendo en cuenta que estos dos aislados fueron recolectados en un mismo hospital, en una misma ciudad, en el mismo año y fueron tipificados con el mismo rST y son muy cercanos, según el árbol del pangenoma (Figura 4.3), es posible que tengan una relación clonal y que probablemente estuvieron involucradas en un brote en el hospital 16 de Risaralda durante el año 2015. De acuerdo con esto, el perfil de resistencia de los genomas completos difiere muy poco y se mantiene conservado en general (Figuras 4.5 y 4.6), al igual que ocurre con los perfiles de resistencia asociados a estos consolidados, ya que no se encuentran verdaderamente conservados en función a la presencia/ausencia de los algunos genes ya mencionados.

Por otra parte, la presencia del gen *bla_{VIM-24}*, no ha sido reportada en ninguna cepa de *P. rettgeri*. Este gen fue reportado por primera vez en un aislado clínico de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* en Barranquilla - Colombia en el año 2011, lo que sugiere una migración hacia el interior del país por pacientes infectados por alguna cepa que albergaba ese gen, contribuyendo a la diseminación de este en otras especies bacterianas, a través de transferencia horizontal de genes. De igual forma, la presencia del gen *bla_{VIM-24}* aumenta la resistencia hacia antibióticos carbapenémicos (Queenan and Bush, 2007), lo que indicaría un papel importante en la resistencia de estos aislados frente a este tipo de antibióticos, como ya fue reportado por el estudio "Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri* durante el periodo 2015-2016", dado por su presencia en secuencias posiblemente plasmídicas.

En cuanto a los consolidados **GMR-RA1153_P** y **GMR-RA257_P**, muestran un perfil de resistencia idéntico dado que ambos comparten en primer lugar seis genes de resistencia a β -lactámicos: *bla_{NDM-1}*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{CMY-2}*, *bla_{VIM-2}* y *bla_{CTX-M-15}*; en segundo lugar tres genes de resistencia a aminoglucósidos: *aadA*, *ANT(2')Ia* y *APH(3')-VI*; en tercer lugar un gen de resistencia a fenol: *cmIA5*; en cuarto lugar un gen de resistencia a fluoroquinolonas: *QnrD1* y por último los dos genes de resistencia a sulfonamidas: *sul1* y *sul2*. Cabe resaltar que la co-existencia de los cinco genes de resistencia a antibióticos β -lactámicos no es compartida por ninguno otro consolidado GMR-RA_P.

Estos dos consolidados plasmídicos pertenecen a aislados con relaciones clonales cuyo perfil de resistencia a nivel de genoma completo no difiere (Figuras 4.5 y 4.6), al igual que su perfil de resistencia plasmídico. La resistencia expuesta por estos aislados puede estar determinada en gran medida por estas secuencias posiblemente plasmídicas, sobre todo en lo que se refiere a la

resistencia a antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos y sulfonamidas, estando severamente potencializada la resistencia a antibióticos β -lactámicos, por la gran cantidad de genes presentes asociados a este tipo de resistencia.

Los perfiles de resistencia de los consolidados **GMR-RA649_P** y **GMR-RA767_P** son muy similares, compartiendo: en primer lugar un gen de resistencia a β -lactámicos: *bla_{NDM-1}*; en segundo lugar un gen de resistencia a aminoglucósidos: *aadA*; en tercer lugar un gen de resistencia a fluoroquinolonas: *QnrD1* y por último un gen de resistencia a diaminopirimidinas: *dfrA1*. Por su parte, GMR-RA767_P tiene un gen adicional *QnrD2* que también le confiere resistencia a fluoroquinolonas.

Por otro lado, si bien estos dos perfiles plasmídicos son casi idénticos, hay algunos genes presentes en el genoma, posiblemente cromosómicos, que pueden estar contribuyendo al fenotipo (Figuras 4.5 y 4.6); por ejemplo la presencia de STR-2, la familia MdtABC-TolC u *omp36* pueden contribuir en conjunto la resistencia a antibióticos β -lactámicos, y por tanto la probabilidad de que la resistencia recaiga solo en *bla_{NDM-1}* es baja. De igual forma ocurre con la resistencia a aminoglucósidos, donde la presencia de genes como *APH(6)-Id* y *APH(3'')-Ib* también pueden estar jugando su rol en la resistencia junto con *aadA* encontrado en ambos consolidados. Aunque, ambos consolidados son cercanos y pueden tener una relación de clonalidad, este resultado muestra un perfil de resistencia posiblemente asociado a plásmidos conservado, aunque se evidencia la presencia/ausencia de un solo gen (Figura 4.4) implicando una pequeña diferencia entre esos perfiles.

Finalmente, los consolidados plasmídicos de **GMR-RA555_P** y **GMR-RA7716_P** son similares ya que comparten: en primer lugar dos genes de resistencia a β -lactámicos: *bla_{NDM-1}* y *bla_{TEM-1}*; en segundo lugar tres genes que confieren resistencia a aminoglucósidos: *aadA1*, *AAC(3')-Ia*, *APH(3')-Ia*; en tercer lugar la presencia de un gen de resistencia a fenol: *catII*; en cuarto lugar la presencia de un gen de resistencia a sulfonamidas: *sul1* y por último la presencia de un gen de resistencia a pirimidinas: *dfrA1*. Sin embargo difieren en cuanto la presencia de dos genes de resistencia a aminoglucósidos *aadA16*, *aadA23* y tres genes de resistencia a tetracilinas *tet(A)*, *tet(D)* y *tetR* en GMR-RA555_P, además de la presencia del gen *aadA15* en GMR-RA7716_P.

Asimismo la comparación de sus genomas completos (Figuras 4.5 y 4.6), sugiere que la resistencia a antibióticos β -lactámicos puede ser debida principalmente a genes de resistencia encontrados en el cromosoma (*bla_{CTX-M-15}*, *bla_{CTX-M-12}*, *bla_{OXA-10}* y *bla_{VIM-2}*). Sin embargo, la resistencia hacia aminoglucósidos y sulfonamidas sugiere ser compartida, ya que algunos determinantes genéticos no presentes en los consolidados, parecen encontrarse en el cromosoma y viceversa (Figura 4.5 y 4.6).

De estas cuatro agrupaciones, GMR-RA649_P y GMR-RA767_P se destaca por su poca complejidad en cuanto a presencia de genes de resistencia se refiere y aunque alberga un gen de resistencia a β -lactámicos (*bla_{NDM-1}*), este es compartido con los 27 perfiles de consolidados plasmídicos, un solo

gen de resistencia a aminoglucósidos, dos a quinolonas y uno a diaminopirimidinas. Por el contrario GMR-RA1153_P y GMR-RA257_P se destacan por la presencia de determinantes genéticos de resistencia a β -lactámicos como bla_{NDM-1} y bla_{TEM-1} , bla_{OXA-10} , bla_{CMY-2} y $bla_{CTX-M-15}$ más otros genes de resistencia a aminoglucósidos y sulfonamidas, que se presentan en mayor cantidad.

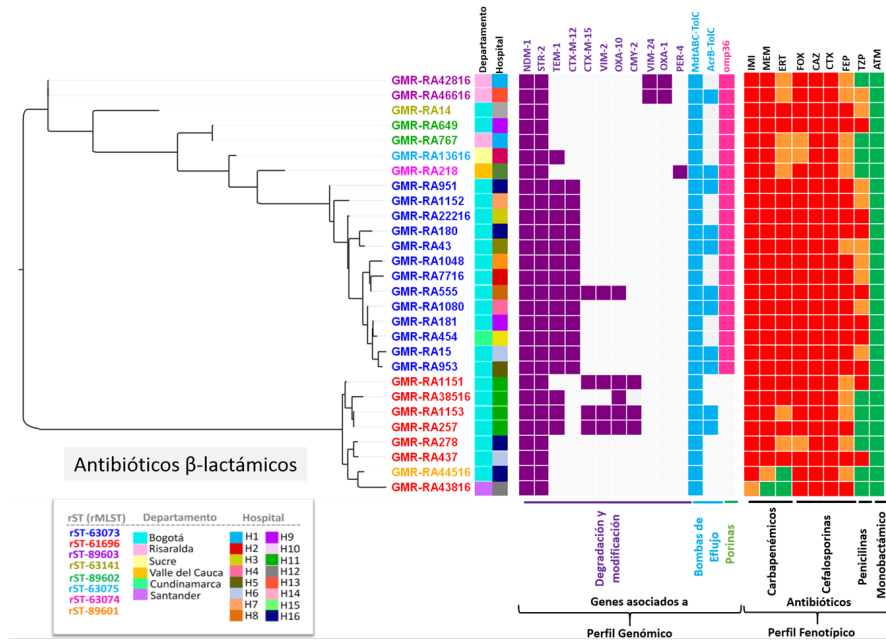


Figura 4.5: Perfil fenotípico de resistencia a antibióticos β -lactámicos de 28 secuencias genómicas de *P. rettgeri*. Tomado de: "Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia de antibióticos β -lactámicos de *Providencia rettgeri* durante el periodo 2015-2016"

Por otro lado la presencia de otros grupos de consolidados plasmídicos que no tienen tanta cercanía pero que se caracterizan por haber sido aislados en un mismo lugar y en algunos, en el mismo año, permite obtener información específica sobre sus perfiles de resistencia y el grado de conservación del perfil plasmídico de estas secuencias. Así, los agrupamientos que se prestan son:

GMR-RA1151_P, GMR-RA1153_P, GMR-RA257_P y GMR-RA38516_P: este grupo de consolidados de secuencias posiblemente plasmídicas se ubican en un mismo clado B del árbol de perfiles plasmídicos (Figura 4.1), de igual forma para las secuencias genómicas de estos aislados (Figura 4.3).

Asimismo, este grupo de aislamientos tuvieron origen en el mismo hospital al sur de la ciudad de Bogotá donde los primeros tres fueron recolectados en el año 2015 y el último en el año 2016; es decir que durante el periodo de un año se encontraban circulando en un mismo hospital, en el servicio de hospitalización y la unidad de cuidados intensivos, siendo el origen de la muestra para todos orina (Anexo B). El perfil de elementos plasmídicos de resistencia presentado por este agrupamiento, en general muestra varios genes de resistencia asociados: bla_{NDM-1} , bla_{TEM-1} , bla_{VIM-2} , bla_{OXA-10} , bla_{CMY-2} , $bla_{CTX-M-15}$, $aadA$, $ANT(2'')-Ia$, $APH(3')-VI$, $catII$ y $cmIA5$, Mrx y $mphA$, $QnrD1$, $sul1$ y $sul2$.

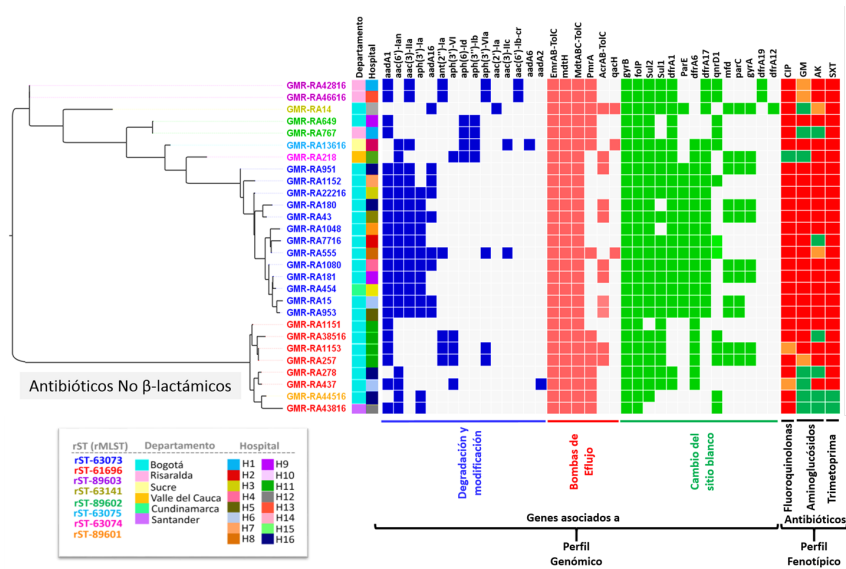


Figura 4.6: Perfil fenotípico de resistencia a antibióticos no β -lactámicos de 28 secuencias genómicas de *P. rettgeri*. Tomado de: "Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia de antibióticos β -lactámicos de *Providencia rettgeri* durante el periodo 2015-2016".

En general este perfil de resistencia se ve conservado, sobre todo por el agrupamiento de GMR-RA1153_P y GMR-RA257_P, como se mencionó anteriormente. Por su parte los consolidados de GMR-RA1151_P y GMR-RA38516_P mantienen los mismos genes de resistencia a aminoglucósidos, fenoles, macrólidos, quinolonas y sulfonamidas solamente, sin ser aislamientos que estén estrechamente relacionados entre sí.

De acuerdo con la comparación con la resistencia fenotípica que presenta GMR-RA1151 y GMR-RA38516, la resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos y sulfonamidas parece mayormente asociada a los consolidados

posiblemente plasmídicos, por la presencia de los genes *bla_{OXA-10}*, *aadA*, *AAC APH* y *sul1*. La resistencia a antibióticos carbapenémicos (IMI-MER-ERT) puede estar dada por la presencia de NDM-1, VIM-2, MdtABC-TolC y *omp36*, mientras que a las cefalosporinas (CAZ-CTX) por genes de la familia CTX, OXA, CMY y STR (Figuras 4.4, 4.5 y 4.6). Igualmente la resistencia a piperaciclina-tazobactam (TPZ) fue variable aunque todas menos GMR-RA1151 albergan el gen *bla_{TEM-1}* que confiere resistencia a TPZ, sin embargo esta variabilidad en la resistencia a TPZ cuando existe este gen ya ha sido reportada en Enterobacterias (Schechter et al., 2018) (Figuras 4.4, 4.5 y 4.6).

GMR-RA22216_P y GMR-RA7716_P: Se encuentran en el clado C en el árbol de perfiles plasmídicos (Figura 4.4) y de igual forma se encuentran cercanas en el árbol del pangenoma de los aislamientos de estudio (Figura 4.3); además pertenecen a aislados que fueron recolectados en un mismo hospital del centro de la ciudad de Bogotá durante el año 2016, fueron aislados de muestras de orina y pertenecen a pacientes que del servicio de hospitalización. Su perfil de resistencia es similar y se conserva en genes de resistencia: *bla_{NDM-1}*, *bla_{TEM-1}*, *aadA*, *AAC(3')-IIa*, *APH(3')-Ia*, *catII*, *sul1* y *dfrA1* y solo difieren en la presencia/ausencia de dos genes asociados a aminoglucósidos y tres asociados a macrólidos. Sin embargo aunque en general son secuencias parecidas, presentan variaciones que implican cambios en esas secuencias y no se conservan en función de la presencia/ausencia de algunos genes (Figura 4.4).

GMR-RA278_P, GMR-RA951_P y GMR-RA180_P: Se encuentran en el mismo clado C del árbol de perfiles plasmídicos (Figura 4.4). Ambos pertenecen a aislados que fueron recolectados en un mismo hospital del norte de la ciudad de Bogotá durante el año 2015 y fueron aislados de muestras de orina. Sus perfiles de resistencia varían entre si y solo se presentan tres grupos de genes que se comparten: *bla_{NDM-1}*, *tet(A)*, *tet(D)*, *tetR* y *dfrA1*. En general el perfil de resistencia no es conservado, lo que indica una variabilidad amplia en estas secuencias posiblemente plasmídicas.

GMR-RA1048_P y GMR-RA555_P: Fueron recolectados en un mismo hospital ubicado en el noroccidente de la ciudad de Bogotá durante el año 2015, tienen un perfil plasmídico mayoritariamente conservado, compartiendo genes de resistencia como: *bla_{NDM-1}*, *bla_{TEM-1}*, *aadA*, *AAC(3')-IIa*, *APH(3')-Ia*, *cmIA5*, *tet(A)*, *tet(D)*, *tetR*, y *dfrA1*. La presencia de tres genes adicionales en GMR-RA555_P (*aadA16*, *aadA23* y *sul1*) son la única diferencia que presentan ambos consolidados (Figura 4.4). De acuerdo a lo anterior, la presencia de NDM-1 y TEM-1, *aadA*, *ACC*, *APH* y *dfrA12* sugiere ser determinante en la resistencia a carbapenémicos (MER- IMI - ERT), a TPZ (aunque para GMR-RA1048 resulta intermedia), a aminoglucósidos (AK-GM) y a sulfonamidas (STX) (Figuras 4.5 y 4.6).

Particularmente la resistencia a antibióticos β -lactámicos, parece estar mediada por genes de resistencia presentes en ambos tipos de secuencia, donde la existencia de genes de la familia CTX y STR parecen jugar un papel en

el fenotipo resistente a cefalosporinas (CAZ-CTX), además de la presencia de genes de la familia VIM y OXA presentes en GMR-RA555 y otros genes asociados a bombas de eflujo y porinas presentes en el cromosoma de ambos aislados (Figura 4.5). En cuanto la resistencia a antibióticos no β -lactámicos, la presencia de genes *aadA*, *AAC* y *APH* en ambos consolidados plasmídicos, pueden estar influenciando la resistencia a aminoglucósidos (AK-GM) posiblemente ayudada por la bomba de eflujo *mdtABC-TolC*, aunque para GMR-RA555 resulte intermedia. De igual manera la presencia de genes *sul1* y *dfrA1* presentes en estas secuencias (la primera de ellas solo en GMR-RA555_P) pueden estar jugando un papel que se evidencia en la resistencia a STX, posiblemente apoyada por gen asociado a porinas *folp* asociada a ambos cromosomas (Figura 4.6).

GMR-RA15_P y GMR-RA437_P: Fueron recolectados en un mismo hospital ubicado en el occidente de la ciudad de Bogotá, durante el año 2015. Estos consolidados tienen un perfil más variado a los anteriormente mencionados, albergando los siguientes genes: *bla_{NDM-1}* y *bla_{TEM-1}*, *aadA*, *AAC(3')-IIa*, *APH(3')-Ia*, *APH(3')-VI*, *aadA23*, *AAC(6')-Ib7*, *aadA2*, *catII*, *Mrx*, *mphA*, *tet(A)*, *tet(D)*, *tetR*, *sul1*, *sul2*, *dfrA1* y *dfrA12*, donde solo comparten los genes *bla_{NDM-1}* y *sul1* (Figura 4.4).

De acuerdo a lo anterior, la presencia de NDM-1 en GMR-RA437 sugiere ser determinante en la resistencia a los carbapenémicos (MER- IMI - ERT), mientras que para GMR-RA15 la presencia de NDM-1 y TEM-1 refleja la resistencia a IMI-MER-ERT y TPZ posiblemente apoyada por *mdtABC-TolC* y *omp36* (asociada principalmente a la resistencia a IMI), presentes en el cromosoma. Asimismo, la presencia de genes *aadA*, *AAC* y *APH* en ambos consolidados, pueden estar relacionados con la resistencia a aminoglucósidos (AK-GM) igualmente ayudada por la bomba de eflujo *mdtABC-TolC*. Los genes *sul1*, *sul2*, *dfrA1* y *dfrA12* presentes en estas secuencias pueden estar jugando un rol en la resistencia a STX, posiblemente apoyada en el gen *folp* encontrada en secuencias asociadas al cromosoma en ambos aislados (Figuras 4.5 y 4.6).

GMR-RA649_P y GMR-RA181_P: Fueron reportados en un mismo hospital del centro de la ciudad de Bogotá durante el año 2015. El perfil de resistencia asociado a secuencias plasmídicas, aunque poco complejo, es variado y está conformado por: *bla_{NDM-1}*, *bla_{TEM-1}*, *aadA*, *AAC(3')-IIa*, *APH(3')-Ia*, *aadA23*, *catII*, *tet(A)*, *tet(D)*, *tetR*, *QnrD1*, *sul1* y *dfrA1*, compartiendo tan solo el gen *bla_{NDM-1}* (Figura 4.4).

Conforme al perfil mencionado, la presencia de NDM-1 puede reflejar la resistencia a antibióticos carbapenémicos en ambos aislados, posiblemente ayudada por los genes *MdtABC-TolC* y *omp36*. Igualmente la presencia de TEM-1 en GMR-RA181_P parece ser eficaz en la resistencia a TPZ, mientras que la presencia de STR-2 en el cromosoma de GMR-RA649 aporta resistencia a las cefalosporinas (FOX-CAZ -CTX), como lo hace también la presencia de CTX-12 en el cromosoma de GMR-RA181 (Figura 4.5). En tanto la resistencia a aminoglucósidos, esta mayormente dada por determinantes

genéticos presentados en el cromosoma de GMR-RA649, ya que su consolidado de posibles secuencias plasmídicas tan solo tiene un gen asociado a la resistencia a esta clase de antibióticos; mientras que en GMR-RA181_P los genes *aadA*, *AAC(3')* y *APH* presentes en su consolidado plasmídico pueden aportar a la resistencia a GM-AK. De igual forma, la resistencia a STX sugiere estar dada en parte por los genes *sul* y *dfrA* presentes en los consolidados plasmídicos GMR-RA181_P y GMR-RA649_P respectivamente. Para finalizar, la resistencia a CIP puede estar determinada tanto por genes presentes en el cromosoma (*gryB*, las bombas de eflujo EmrAB-TolC y *mdtH*) como por el gen *QnrD1*, presente en el consolidado de secuencias asociadas a plásmidos en GMR-RA649_P; mientras que para GMR-RA181 está dada por los determinantes genéticos presentados en el cromosoma (Figura 4.6).

Los resultados anteriores evidencian la existencia de subclados de secuencias posiblemente plasmídicas que se forman independientemente de sus relaciones sociodemográficas, teniendo en cuenta el hospital, la ciudad de recolección y el año en que fue reportado. Estos agrupamientos muestran diversos perfiles de resistencia a antimicrobianos, de los cuales solo uno está conservado debido a la relación clonal entre los aislados GMR-RA1153_P y GMR-RA257_P, razón por la cual se esperaba que su perfil se conservara al 100%. En este caso la resistencia fenotípica a β -lactámicos y a sulfonamidas en general, está dada por plásmidos, al igual que la resistencia a aminoglucósidos, aunque para estos últimos también puede estar mediada por otros determinantes cromosomales.

Por otra parte, el segundo grupo de aislados que tienen bastante similitud entre sus datos sociodemográficos y sus perfiles plasmídicos son GMR-RA42816_P y GMR-RA46616_P; en estos la resistencia a antibióticos β -lactámicos, sulfonamidas y fluoroquinolonas parece estar mayormente relacionada con genes presentes en sus secuencias plasmídicas. Sin embargo la existencia de otros determinantes genéticos que se presentan probablemente en el cromosoma podrían contribuir en la resistencia expuesta por estos aislados; mientras que la resistencia a aminoglucósidos podría ser compartida entre secuencias plasmídicas y cromosomales. Así, por su cercanía y su estrecha relación sociodemográfica, era de esperarse un perfil de resistencia prácticamente idéntico. Sin embargo, la presencia/ausencia de tres genes puede estar indicando la rápida variación propia de este tipo de secuencias, en la que pueden verse involucradas secuencias de integrones (Tolmasky and Alonso, 2015).

Otros consolidados plasmídicos bastante cercanos son GMR-RA649_P y GMR-RA767_P, que aunque no comparten el mismo lugar de recolección de aislado, presentan el mismo rST en sus secuencias de genoma completo y fueron reportadas el mismo año, además de compartir el mismo perfil de resistencia. Así, cuando se observan ambos perfiles de elementos genómicos de resistencia (Figuras 4.4, 4.5 y 4.6), puede notarse que la resistencia a antibióticos β -lactámicos y fluoroquinolonas parece compartida entre genes presentes en el resistoma de plásmidos y genes que solo están presentes en el

resistoma del cromosoma bacteriano. Por el contrario, la resistencia a sulfonamidas puede estar mediada por genes posiblemente plasmídicos. Asimismo, la ausencia de un solo gen que no se comparte podría evidenciar el "inicio" de la divergencia de estas secuencias.

Por ultimo otras secuencias cercanas observadas en la comparación de los genomas completos, el dendograma y la comparación de consolidados plasmídicos fueron las de los aislados GMR-RA555_P y GMR-RA7716_P. Estos aunque no son tan cercanos como los ya mencionados, muestran un perfil de resistencia plasmídico similar y al comparar con el resistoma de las secuencias de genoma completo de GMR-RA555 se aprecia que la resistencia a β -lactámicos no está dada primordialmente por secuencias asociadas a plásmidos, como ocurre también en GMR-RA7716. La resistencia a aminoglucósidos y sulfonamidas parece ser compartida entre genes de las secuencias plasmídicas y genes presentes en el resistoma del genoma completo. Así, dada la relativa cercanía entre estos dos consolidados de secuencias posiblemente plasmídicos, la variabilidad entre ambas se presenta en función de la presencia/ausencia de genes asociados con la resistencia a aminoglucósidos y macrólidos, lo que sugiere que a pesar de su cercanía es probable que la adquisición de nuevos genes por parte de GMR-RA555_P sea debida a la rapidez con que *P. rettgeri* puede realizar la transferencia horizontal de genes.

Por otro lado, los perfiles observados en otros subclados que tienen alguna relación sociodemográfica pero que no tienen una relación cercana, también fueron analizados. Así, uno de los agrupamientos más grandes representados por los consolidados plasmídicos GMR-RA1151_P, GMR-RA1153_P, GMR-RA257_P y GMR-RA38516_P, exhibió un perfil plasmídico que albergaba un arsenal de genes de resistencia a β -lactámicos los cuales son compartidos en su mayoría, como ocurre también con el perfil de resistencia a aminoglucósidos y sulfonamidas.

Los consolidados plasmídicos GMR-RA22216_P y GMR-RA7716_P presentan en general un perfil de resistencia en el que la variabilidad está dada por la presencia/ausencia de genes, que además parecen aportar a la resistencia tanto a antibióticos β -lactámicos como no β -lactámicos (Figuras 4.4, 4.5 y 4.6).

Otro de los consolidados relacionados son GMR-RA278_P, GMR-RA951_P y GMR-RA180_P, donde se observa que el perfil plasmídico de resistencia a β -lactámicos está compuesto por uno a tres genes asociados a la resistencia a esta clase de antibióticos (*bla_{NDM-1}*, *bla_{CTX-M12}* y *bla_{TEM-1}*), mientras que en el resistoma del genoma completo se observan más determinantes de resistencia a β -lactámicos, razón por la cual sugiere que la resistencia a esta clase de antibióticos es mayoritariamente dada por genes presentes en el cromosoma; de forma similar ocurre con los perfiles plasmídicos de resistencia a aminoglucósidos y sulfonamidas (Figuras 4.4, 4.5 y 4.6).

Por otro lado, el aislamiento GMR-RA555 presenta un arsenal genético de resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos, sulfonamidas y quinolonas en su resistoma de genoma completo, de los cuales trece se encuentran en el perfil

plasmídico asociado a este aislado, evidenciando que la resistencia podría ser compartida entre genes presentes en el plásmidos y genes presentes en el cromosoma. Por su parte GMR-RA1048_P en comparación con el resistoma del genoma completo, sugiere que la resistencia a aminoglucósidos está dada por los determinantes presentes en sus secuencias plásmidicas y la resistencia a sulfonamidas podría ser compartida entre genes presentes en las secuencias plasmídicas y secuencias cromosomales (Figuras 4.4, 4.5 y 4.6).

La comparación del resistoma del genoma completo y el resistoma de los consolidados de secuencias plasmídicas de los aislados GMR-RA15_P y GMR-RA437_P, sugiere que en GMR-RA437 la resistencia a antibióticos β -lactámicos está mediada por genes presentes en plásmidos, mientras que en GMR-RA15 la resistencia a esta clase de antibióticos está dada por genes presentes en el cromosoma. Caso diferente es la resistencia a aminoglucósidos y sulfonamidas que para esos aislamientos esta compartida entre ambos tipos de secuencias (Figuras 4.4, 4.5 y 4.6).

Finalmente, los consolidados plasmídicos de GMR-RA649_P y GMR-RA181_P, evidencian menor complejidad particularmente en GMR-RA649_P, ya que no tienen tantos genes asociados a la resistencia en su perfil plasmídico, razón que sugiere que la resistencia a antibióticos β -lactámicos y no β -lactámicos recae más en los determinantes genéticos presentes en el cromosoma del aislado GMR-RA649; mientras que en GMR-RA181 la resistencia a antibióticos no β -lactámicos parece ser compartida (Figuras 4.4, 4.5 y 4.6).

Estos resultados muestran que los perfiles plasmídicos no son conservados y su relación es independiente de las relaciones sociodemográficas cercanas entre los aislamientos, esto puede deberse a la facilidad con que *P. rettgeri* adquiere estos plásmidos gracias a la transferencia horizontal de genes o a la presencia de elementos móviles que permanentemente están facilitando el cambio en el genoma de esta bacteria. De todas formas existen al menos cuatro pares de secuencias asociadas a plásmidos que en general se mantienen con algunos cambios en fusión de la relación cercana preexistente de los aislados de origen.

Finalmente, cabe resaltar que no se puede asegurar que el 100% de los *contigs* seleccionados son parte de secuencias de plásmidos, aunque existe una alta probabilidad que estén asociados a este tipo de secuencias dadas las condicionales de clasificación que se tuvieron en cuenta en el desarrollo del *pipeline*. Asimismo, la asociación de estas secuencias a la resistencia fenotípica que exhibe cada aislamiento es hipotética, puesto que no se puede asegurar con certeza que los genes presentes en las secuencias de estudio estén coadyuvando en dicho fenotipo, es decir que se estén expresando, ya que para esto es necesario realizar experimentos adicionales como RNAseq, que aquí no se presentan, ya que el objetivo de este estudio fue la caracterización genotípica de resistencia en función a datos NGS.

En resumen, las 28 secuencias genómicas de *Providencia rettgeri* en general muestran una plasticidad genómica dada por la variabilidad aportada por secuencias extracromosomales como sugieren las comparaciones realizadas

aquí, donde algunos de los genes asociados a resistencia (β -lactámicos y no β -lactámicos) que se encuentran asociadas al plásmido van variando en cada perfil de elementos genómicos plasmídicos, concordando con estudios previamente publicados (Olaitan et al. 2015; Marquez-Ortiz et al. 2017a; Galac and Lazzaro 2012).

4.3.3. *Análisis comparativo con secuencias de plásmidos de P. rettgeri reportadas*

La construcción del árbol filogenético que compara las posibles secuencias plasmídicas de los 28 aislamientos de estudio con las once secuencias de plásmidos de *P. rettgeri* previamente reportadas, se realizó mediante Roary (Figuras 4.7 y 4.8). Esta comparación se realizó también con información de datos metagenómicos como familia de incompatibilidad, año y país de recolección del aislado.

Como se aprecia en la Figura 4.7 la diversidad de las secuencias es amplia, las distancias y agrupamientos son variados, pero los agrupamientos observados a lo largo del estudio se mantienen. En detalle se observa una relación directa entre las secuencias plasmídicas de **GMR-RA43816_P** y el plásmido de referencia **pRB151-NDM**. Este plásmido de referencia fue el primer reporte de NDM-1 en *P. rettgeri* en Colombia, proveniente de la ciudad de Bucaramanga. Ambos fueron aislados de muestras de orina y provienen del departamento de Santander aunque en años distintos; esto demuestra una concordancia geográfica, además porque ambos aislados comparten el mismo rST61696 dato que se reporta en el estudio genómico preliminar. pRB151-NDM es un plásmido menos complejo que p16Pre36-NDM, que codifica para una maquinaria de transferencia conjugativa y solo alberga el gen *bla_{NDM-1}* en una región variable Tn125 (Marquez-Ortiz et al. 2017a; Marquez-Ortiz et al. 2017a). Por su parte el consolidado plasmídico de GMR-RA43816_P tampoco es complejo en términos de presencia de genes de resistencia, al igual de pRB151-NDM tiene el gen *bla_{NDM-1}*, aunque se diferencia de este por la presencia del gen *QnrD1*. Así la relación entre pRB151-NDM y GMR-RA43816_P podría estar dada al compartir un gen de resistencia a antibióticos β -lactámicos presentes en ambos.

De igual forma existe una relación entre **GMR-RA218_P** y el plásmido de referencia **AR_0082**, aunque más distante que la anterior. La secuencia de referencia AR_0082 muestra relaciones con variadas especies de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Citrobacter freundii* o *Salmonella enterica*. Asimismo este plásmido presenta el gen *bla_{NDM-1}* como único gen representante de resistencia a los β -lactámicos. La presencia de mayor número de genes de resistencia a sulfonamidas/diaminopirimidinas en la secuencia de estudio (Figura 4.4), sugiere que la relación con este plásmido puede estar dada por la presencia de los genes *bla_{NDM-1}* y *sul1* y otros de-

terminantes genéticos, aunque posiblemente en distintos ambientes genéticos, teniendo en cuenta que diversos estudios han publicado el re arreglamiento de secuencias transponibles asociadas a bla_{NDM-1} (Marquez-Ortiz et al. 2017a; Mataseje et al. 2013). De igual forma GMR-RA218_P y AR_0082 fueron asignados a la misma familia de incompatibilidad IncA/C, lo que aumenta la relación entre estas dos secuencias, aunque muestran diferencias como la presencia de los genes $aadA2$ y $dfrA12$ en GMR-RA218_P (Tabla 4.1).

	NDM-1	sul1	aadA2	dfrA12
GMR-RA218_P				
AR_0082				

Tabla 4.1: Genes de resistencia compartidos entre GMR-RA218_P y el plásmido de referencia AR_0082 de *P. rettgeri*

Por otra parte **p16Pre36** y **GMR-RA1152_P** comparten algunos genes de resistencia que los hace no tan distantes. p16Pre36 es un plásmido de referencia reportado en Colombia, ambas son secuencias que albergan el gen bla_{NDM-1} y pertenecen a aislados reportados en Bogotá durante el 2015. Por su parte p16Pre36 fue el primer plásmido NDM-1 más grande jamás reportado (Marquez-Ortiz et al., 2017a) con un tamaño de 224,116pb, dos regiones putativas asociadas a la regiones de transferencia conjugativa (Trape) que solo habían sido reportadas en pPrY2001 hasta el 2015 (Mataseje et al., 2013) y una región Tra1 de transferencia asociada a plásmidos de la familia IncA/C2 que esta generalmente asociada a plásmidos ampliamente distribuidos en Enterobacterias (Sekizuka et al., 2011). Por su parte el consolidado plasmídico de GMR-RA1152_P comparte la presencia de genes de resistencia como bla_{TEM-1} , $dfrA$, $aadA1$, $sul1$, $aadA$, $aadA16$ y una variante tet (Marquez-Ortiz et al., 2017a) de resistencia a tetracilinas, con el plásmido de referencia p16Pre36, lo cual explica la cercanía que presentan estas dos.

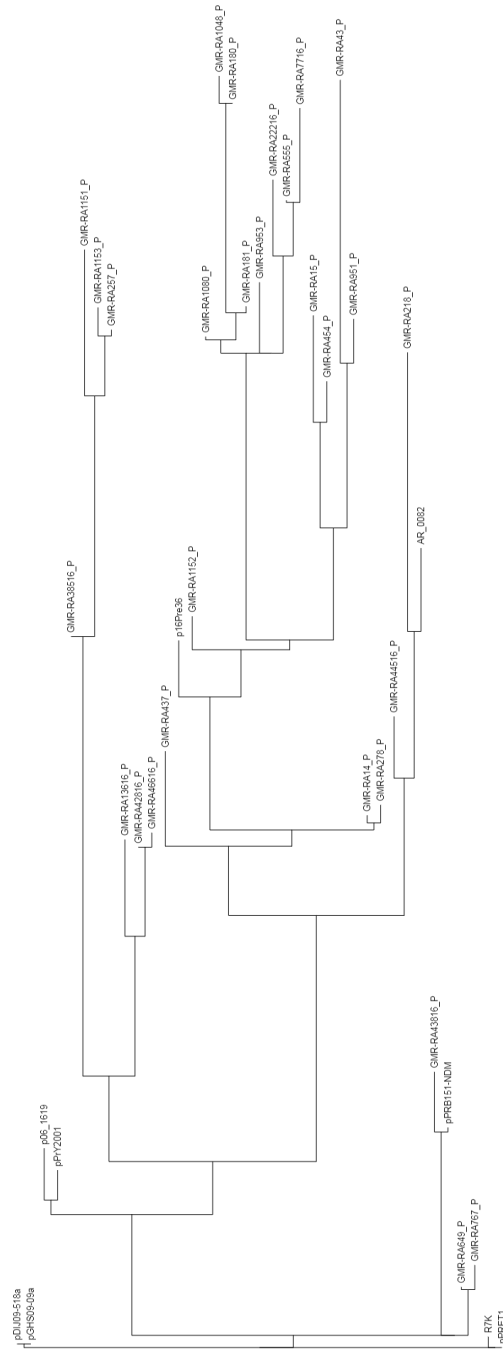


Figura 4.7: Árbol de secuencias plasmídicas de 28 aislamientos de *P. rettgeri* contra 11 secuencias de referencia de plásmidos reportados

	TEM-1	sul1	dfrA1	sul2	NDM-1	AAC(6') -Iaa	AAC(3) -IIc
GMR-RA 1152_P							
p16Pre36							
	aadA	APH(3') -Ia	dfrA6	tet(B)	aadA16	tetR	
GMR-RA 1152_P							
p16Pre36							

Tabla 4.2: Genes de resistencia compartidos entre GMR-RA1152_P y el plásmido de referencia p16Pre36 de *P. rettgeri*

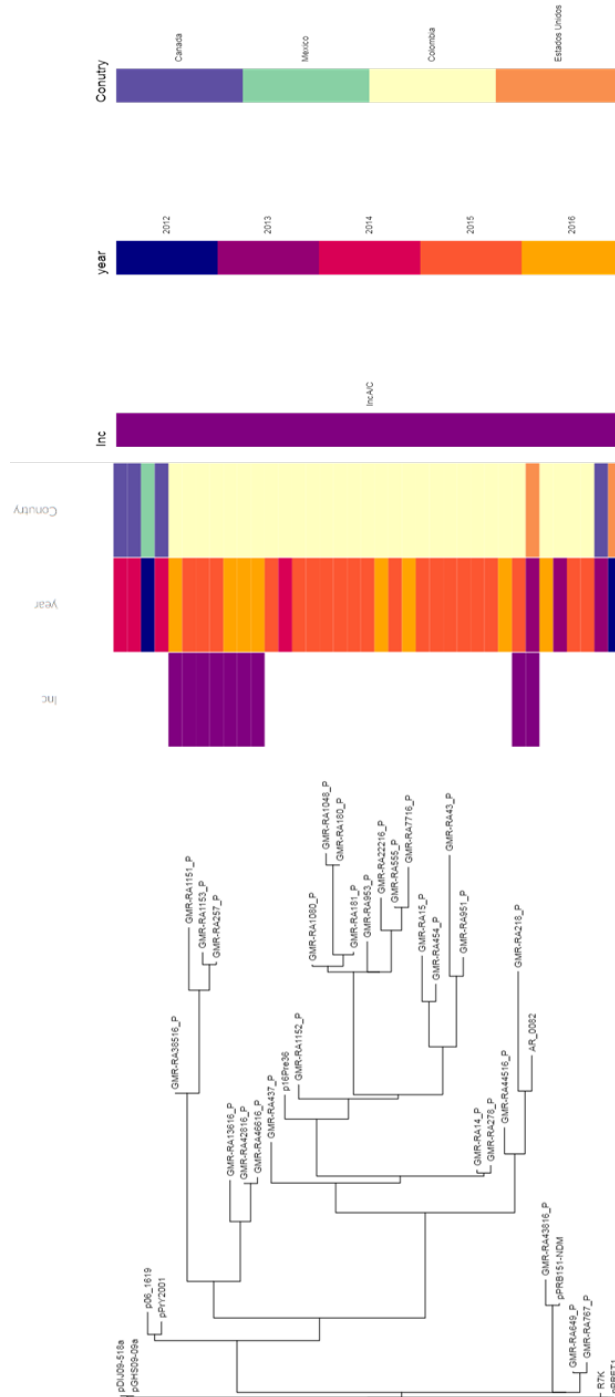


Figura 4.8: Árbol de secuencias plasmídicas de 28 aislamientos de *P. rettgeri* contra 11 secuencias de referencia de plásmidos reportados. Inc: Familia de Incompatibilidad; Year: año; Country: País.

Por otro lado, la asignación por familia de incompatibilidad entendida como un término de clasificación para secuencias plasmídicas, que se da a partir del rango de número de copias y la capacidad de coexistir en una misma célula huésped, fue determinada en solo 8 de las 28 secuencias plasmídicas: GMR-RA38516_P, GMR-RA1151_P, GMR-RA1153_P, GMR-RA257_P, GMR-RA13616_P, GMR-RA42816_P, GMR-RA46616_P y GMR-RA218_P. Esta asignación realizada a partir de una base de datos MLST (Multilocus sequence type) de secuencias de genoma de especies bacterias (Carattoli et al., 2014), no pudo asignar 20 secuencias plasmídicas debido en parte a que no existe un esquema MLST para secuencias de aislados de *P. rettgeri*. Para las 8 secuencias asociadas a plásmidos, el parámetro de asignación fue la presencia del gen *repA* comúnmente asociado a plásmidos IncA/C.

En conclusión, esta comparación evidenció la divergencia entre las secuencias posiblemente plasmídicas colombianas presentes en *P. rettgeri*, además se vio un incremento de publicaciones que reportan la aparición de cepas de *P. rettgeri*-NDM positivas y la asociación de su perfil de resistencia a plásmidos, a partir del año 2014 (Mataseje et al. 2013; Marquez-Ortiz et al. 2017b; Marquez-Ortiz et al. 2017a); aunque previamente ya existían estudios que las reportaban (Galac and Lazzaro 2012; Revilla et al. 2008) en aislados no humanos. Asimismo, las secuencias de referencia y las de estudio no reflejan una relación estrecha, lo que demuestra la variabilidad y divergencia genética de este tipo de secuencias en aislamientos de *P. rettgeri* circulando en instituciones hospitalarias colombianas.

Capítulo 5

Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

Todos los aislados de *Providencia rettgeri* albergan plásmidos, en su mayoría $> 50KB$, con la presencia del gen bla_{NDM-1} en 27 de los 28 aislamientos.

La identificación de elementos plasmídicos mediadores de resistencia en los 568 *contigs* asociados a plásmidos, permitió la identificación 41 diferentes genes asociados con la resistencia a antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, fenoles, macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas y sulfonamidas/diaminopirimidinas: Estos representan el 35% de los genes RAM reportados en el genoma completo. La mayoría de ellos asociados al mecanismo de acción de degradación y modificación de antibióticos.

Los genes más frecuentemente encontrados en las secuencias plasmídicas de los 28 aislamientos de estudio fueron: bla_{NDM-1} , $sul1$, $aadA$, bla_{TEM-1} , $dfrA1$, $tet(A)$, $tet(D)$, $tetR$, $catII$ y $AAC(3')-IIa$.

Los datos de PlasmidSPAdes en conjunto con los resultados de extracción de DNA, permitieron establecer un promedio 2 plásmidos por aislado de *P. rettgeri*. Además los aislamientos que albergan el gen bla_{NDM-1} muestran en promedio 12 genes de resistencia dentro de un mismo perfil plasmídico, confirmado que bla_{NDM-1} está asociado a otros genes de resistencia.

En general, el consolidado de secuencias posiblemente plasmídicas se divide en tres clados, que a su vez van divergiendo conforme sus secuencias varían y presentan un perfil de resistencia antimicrobiana específico. Cuatro pares de secuencias con genes de resistencia conservados en función a la posible relación clonal de los aislamientos de origen fueron encontrados (GMR-RA1153_P - GMR-RA257_P, GMR-RA42816_P - GMR-RA46616_P y GMR-RA649_P - GMR-RA767_P y GMR-RA555_P - GMR-RA7716_P), así como otras secuencias con la variabilidad típica de este tipo de secuencias en función a la transferencia horizontal de genes.

Los perfiles plasmídicos no son conservados y su relación es independiente de las relaciones sociodemográficas cercanas entre los aislamientos, mostrando la facilidad que tiene *P. rettgeri* para adquirir o modificar sus plásmidos gracias a la transferencia horizontal de genes o la presencia de elementos móviles que permanentemente están facilitando el cambio en el genoma de esta bacteria.

La capacidad que tiene *P. rettgeri* para adquirir o modificar sus plásmidos, le ha permitido adquirir distintos mecanismos de resistencia que hace que esta especie sea potencialmente peligrosa.

La comparación con plásmidos previamente reportados evidenció su divergencia con las secuencias posiblemente plasmídicas presentes en los aislamientos de *P. rettgeri* estudiados, reflejando re arreglamientos genéticos que muestran una alta variabilidad y divergencia genética.

5.2. Recomendaciones

Para posteriores estudios, es necesaria una comparación más detallada de las profundidades de las herramientas de ensamblaje SPAdes y PlasmidSPAdes, así como también la comparación de asignaciones con blastn de ambas herramientas, con el fin de confirmar la presencia de plásmidos grandes y determinar el número de los mismos por aislado.

Igualmente, la secuenciación por plásmido extraído a partir de tecnologías de secuenciación como PacBio, permitiría la circularización de las secuencias obtenidas a partir de *scaffolding* y cerrado de gaps.

El uso de algoritmos como Expectation-Maximitation o algoritmo EM, permitirá obtener *contigs* asociados a plásmidos con mayor certeza, ya que el empleo de este se basa en el recalcu de los resultados obtenidos maximizando la probabilidad de que cada secuencia sea correctamente clasificada.

Por último, es necesaria la inclusión de un mayor número de aislamientos de *Providencia rettgeri* con el fin de obtener más información sobre la situación nacional, sobre todo en aislamientos que alberguen el gen *bla_{NDM-1}*.

Anexo A

Concentración de DNA plasmídico

Registro interno	Concentración (ng/uL)	Registro interno	Concentración (ng/uL)
GMR - RA 14	207	GMR-RA 953	186
GMR - RA 15	197	GMR-RA 1048	493
GMR - RA 43	439	GMR-RA 1080	280
GMR - RA 180	360	GMR-RA 1151	142
GMR - RA 181	338	GMR-RA 1152	79,5
GMR - RA 218	348	GMR-RA 1153	401
GMR-RA 257	439	GMR-RA 77.16	416
GMR-RA 278	75,1	GMR-RA 136.16	85,9
GMR-RA 437	260,6	GMR-RA 222.16	250
GMR-RA 454	126,3	GMR-RA 385.16	95,6
GMR - RA 555	439	GMR-RA 428.16	111,7
GMR - RA 649	345	GMR-RA 438.16	95,6
GMR-RA 767	340	GMR-RA 445.16	172,7
GMR-RA 951	462	GMR-RA 466.16	172,3

Anexo B
datos sociodemográficos

Registro interno	Año	Departamento	Servicio	Edad	Muestra	Diagnóstico
GMR - RA 14	2015	Bogotá		30	Orina	Cáncer de cerebro
GMR - RA 15	2015	Bogotá		24	Orina	Infección de vías urinarias
GMR - RA 43	2015	Bogotá		91	Orina	Insuficiencia cardio - respiratoria
GMR - RA 180	2015	Bogotá		67	Orina	infección de vías urinarias
GMR - RA 181	2015	Bogotá		90	Orina	infección de vías urinarias
GMR - RA 218	2015	Valle		71	Secreción pie	Diabetes mellitus
GMR-RA 257	2015	Bogotá		54	Orina	IVU
GMR-RA 278	2015	Bogotá		SD	Orina	SD
GMR-RA 437	2015	Bogotá		21	Orina	infección de vías urinarias
GMR-RA 454	2015	Cundinamarca		56	Orina	infección de vías urinarias
GMR - RA 555	2015	Bogotá		31	Sangre	VIH
GMR - RA 649	2015	Bogotá		90	Orina	infección de vías urinarias
GMR-RA 767	2015	Risaralda	Cirugía	55	Hueso	Osteomielitis
GMR-RA 951	2015	Bogotá	Cirugía	67	Orina	Infección de vías urinarias
GMR-RA 953	2015	Bogotá	608-1	34	Tejido muscular	Sepsis
GMR-RA 1048	2015	Bogotá	Medicina interna	86	Orina	Trauma craneoencefálico
GMR-RA 1080	2015	Bogotá	UCI adultos	89	Sangre	Sepsis
GMR-RA 1151	2015	Bogotá	Hospitalización	78	Orina	Infarto agudo
GMR-RA 1152	2015	Bogotá	Hospitalización	72	Orina	Infección de vías urinarias
GMR-RA 1153	2015	Bogotá	UCI	74	Orina	Infección de vías urinarias
GMR-RA 77.16	2016	Bogotá	Hospitalización	39	Orina	Cáncer
GMR-RA 136.16	2016	Sucre	CREV	23	Orina	Hipertensión
GMR-RA 222.16	2016	Bogotá	Gaica	66	Orina	Cáncer
GMR-RA 385.16	2016	Bogotá	UCI	83	Orina	Infección de vías urinarias
GMR-RA 428.16	2016	Risaralda	Qx 319	68	Orina	Insuficiencia cardíaca
GMR-RA 438.16	2016	Santander	Habitación 543	26	Orina	Traumatismo vasos sanguíneos
GMR-RA 445.16	2016	Bogotá	C. externa	Sin dato	Orina	Infección vías urinarias
GMR-RA 466.16	2016	Risaralda	Urgencias	55	Orina	Infección Renal crónica

Anexo C
Ensamblaje y anotación de los genomas

Aislamiento	N° Contigs	Profundidad	Tamaño del genoma	GC (%)	N50	CDs	rRNAs	tRNAs	Genes predichos
GMR-RA 14	39	227x	4579954	40,87	329906	4173	8	73	4255
GMR-RA 15	58	201x	4852621	40,5	204017	4517	5	69	4592
GMR-RA 43	53	185x	4934262	40,62	225811	4622	7	68	4698
GMR-RA 180	52	237x	4814681	40,54	208039	4459	6	68	4534
GMR-RA 181	58	184x	4911065	40,53	204764	4587	7	69	4664
GMR-RA 218	56	143x	4766734	40,51	226267	4408	5	71	4485
GMR-RA 257	76	744x	4822225	40,49	159975	4451	7	71	4523
GMR-RA 278	60	711x	4758004	40,4	156840	4404	7	71	4476
GMR-RA 437	71	777x	4804601	40,41	155159	4464	7	71	4536
GMR-RA 454	54	707x	4894474	40,52	207145	4697	10	75	4697
GMR-RA 555	64	870x	5044054	40,65	203884	4739	10	69	4809
GMR-RA 649	53	767x	4560549	40,7	203559	4211	8	69	4281
GMR-RA 767	52	918x	4580360	40,69	219461	4230	8	70	4301
GMR-RA 951	59	138x	4865680	40,49	225811	4499	7	68	4575
GMR-RA 953	56	144x	4947665	40,59	225682	4634	4	69	4708
GMR-RA 1048	59	615x	4935238	40,64	225682	4618	10	69	4688
GMR-RA 1080	61	183x	4945625	40,55	207145	4631	6	69	4707
GMR-RA 1151	79	785x	4796988	40,57	146975	4420	7	71	4492
GMR-RA 1152	53	612x	4765864	40,49	231263	4422	10	68	4491
GMR-RA 1153	74	216x	4817971	40,48	167517	4452	7	71	4523
GMR-RA 77.16	63	622x	4988309	40,63	200124	4646	10	68	4715
GMR-RA 136.16	56	192x	4659071	40,33	228808	4314	9	70	4394
GMR-RA 222.16	62	164x	5025093	40,61	225748	4688	6	68	4763
GMR-RA 385.16	69	724x	4821461	40,6	167333	4452	6	71	4524
GMR-RA 428.16	37	756x	4553004	40,61	394854	4233	5	71	4305
GMR-RA 438.16	68	776x	4712137	40,07	178657	4335	9	70	4406
GMR-RA 445.16	50	872x	4680709	40,41	159963	4307	7	71	4379
GMR-RA 466.16	34	821x	4564007	40,65	485478	4242	5	71	4314

Anexo D
consolidado de *contigs* asociados a
plásmidos

Aislamiento	contig.id	Cover	plasmid	PlasF	Chrom DB	Plasm DB	Ttest	N° contigs	Tamaños	N° contigs Chrom
GMR-RA14	NODE_39	1	1	0	0	1	3		1746	
	NODE_25	0	0	1	1	1	3		41478	
	NODE_38	1	1	0	0	1	3		1763	
	NODE_30	0	0	1	0	1	2		14607	
	NODE_28	0	1	1	0	1	3		17091	
	NODE_15	0	0	1	1	1	3	11	65158	28
	NODE_37	0	0	1	1	0	2		1856	
	NODE_36	1	1	1	1	0	4		1945	
	NODE_17	0	1	1	1	1	3		63574	
	NODE_31	1	1	1	0	1	3		12965	
	NODE_32	0	1	1	1	1	4		9192	
GMR-RA15	NODE_55	1	0	0	1	1	3	16	1303	42
	NODE_51	0	0	1	0	1	2		2076	
	NODE_23	0	0	1	1	0	2		86035	
	NODE_35	0	1	1	0	1	3		28034	
	NODE_54	0	0	1	1	1	3		1570	
	NODE_46	0	0	1	0	1	2		11930	
	NODE_44	0	0	1	1	1	3		18016	
	NODE_42	0	0	1	1	1	3		19204	
	NODE_57	1	0	0	0	1	2		1139	
	NODE_28	0	1	1	0	1	3		49966	
	NODE_31	0	1	0	1	0	2		34025	
GMR-RA43	NODE_53	0	0	1	1	0	2		1655	
	NODE_48	0	0	1	1	1	3		7572	
	NODE_58	1	0	0	0	1	2		1113	
	NODE_33	1	1	1	1	1	5		29675	
	NODE_47	0	0	1	1	1	3		8314	
	NODE_24	0	1	0	1	0	2	17	52526	36
	NODE_20	1	0	1	1	1	4		103876	
	NODE_53	1	1	0	0	1	3		1113	
	NODE_49	1	1	0	1	1	4		1303	
	NODE_51	0	0	1	1	1	3		1200	
	NODE_36	0	0	1	1	1	3		19204	
NODE_43	1	0	1	0	1	3		2923		
NODE_50	1	1	0	0	1	3		1252		
NODE_40	0	0	0	0	1	2		6797		

Aislamiento	contig.id	Cover	plasmis	PlasF	Chrom DB	Plasm DB	Ttest	N° contigs	Tamaños	N° contigs Chrom
GMR-RA43	NODE_44	1	1	1	1	1	5		2845	
	NODE_42	0	1	1	1	0	3		3814	
	NODE_39	0	0	1	0	1	2		10532	
	NODE_48	0	0	0	1	1	2		1571	
	NODE_38	0	0	1	1	1	3		11658	
	NODE_29	0	1	0	1	0	2		29666	
	NODE_30	0	0	1	0	1	2		27691	
	NODE_37	0	0	1	0	1	2		12421	
	NODE_17	0	0	1	0	0	2		121238	
	NODE_20	1	0	1	1	1	4		103876	
	NODE_41	0	0	1	0	1	2		10283	
	NODE_50	1	0	1	1	1	4		1303	
	NODE_52	1	0	1	0	1	3		1113	
	NODE_46	0	0	1	1	1	3		2313	
GMR-RA180	NODE_49	0	0	1	1	1	3	14	1571	38
	NODE_42	0	0	0	1	1	2		6797	
	NODE_43	0	0	1	0	1	2		4640	
	NODE_33	0	0	1	0	1	2		27691	
	NODE_40	0	0	1	0	1	2		10532	
	NODE_48	0	0	1	1	0	2		1655	
	NODE_51	0	0	1	1	1	3		1200	
	NODE_39	0	0	1	1	1	3		19204	
	NODE_54	0	0	1	1	1	3		1200	
	NODE_44	0	0	0	1	1	2		6797	
	NODE_51	0	0	0	1	0	2		1655	
	NODE_45	0	1	1	0	1	3		4640	
	NODE_58	0	0	1	1	0	2		1007	
	NODE_42	0	0	0	1	1	2		8314	
NODE_53	1	0	0	1	1	4		1303		
GMR-RA181	NODE_48	1	1	1	0	1	4	19	2076	39
	NODE_57	1	0	0	0	1	2		1040	
	NODE_56	1	0	0	0	1	2		1113	
	NODE_37	0	0	1	1	1	3		19204	
	NODE_19	0	0	1	1	0	2		121235	
	NODE_52	0	0	0	1	1	2		1570	
	NODE_55	0	0	0	1	1	2		1174	
NODE_16	0	0	0	1	0	2		132162		

Aislamiento	contig.id	Cover	plasmid	PlasF	Chrom DB	Plasm DB	Ttest	N° contigs	Tamaños	N° contigs Chrom
	NODE_26	0	1	1	1	1	4		60710	
	NODE_48	0	0	1	1	1	3		3131	
	NODE_35	0	1	1	0	1	3		27690	
	NODE_64	1	0	0	0	1	2		1002	
	NODE_44	0	1	0	1	1	3		6797	
	NODE_49	1	1	1	0	1	4		2923	
	NODE_46	0	0	1	1	1	3		5358	
	NODE_61	1	0	1	0	1	3		1113	
	NODE_62	0	1	1	1	1	4		1030	
	NODE_47	0	1	1	0	1	3		4766	
	NODE_59	1	0	1	1	1	4		1303	
	NODE_50	1	0	0	0	1	2		2328	
	NODE_56	0	0	0	1	1	2		1571	
	NODE_23	0	1	1	0	1	3		77820	
	NODE_60	0	1	0	0	1	2		1162	
	NODE_30	0	1	1	1	1	4		42603	
	NODE_55	0	1	1	0	1	3		1595	
	NODE_52	0	1	1	0	1	3		2028	
	NODE_45	0	1	0	1	1	3		5552	
	NODE_54	0	0	1	1	0	2		1655	
	NODE_24	0	1	1	1	0	3		75818	
	NODE_43	0	1	1	0	1	3		10532	
	NODE_38	0	1	1	1	0	3		22413	
	NODE_51	0	1	1	0	1	3		2076	
	NODE_50	1	1	0	0	0	2		1165	
	NODE_23	0	0	1	1	0	2		57548	
	NODE_51	1	1	1	0	1	4		1097	
	NODE_46	0	0	1	1	0	2		1911	
	NODE_48	1	1	0	0	1	3		1607	
	NODE_45	0	0	1	0	1	2		2339	
	NODE_44	1	1	1	1	1	5		2770	
	NODE_52	1	0	1	1	1	4	14	1077	39
	NODE_19	0	0	1	1	0	2		93437	
	NODE_40	0	0	0	1	1	2		7745	
	NODE_13	0	1	0	1	0	2		156008	
	NODE_49	1	0	0	1	1	3		1224	
	NODE_47	0	0	1	1	0	2		1626	
	NODE_38	0	0	1	0	1	2		10793	

GMR-RA555

GMR-RA649

Aislamiento	contig.id	Cover	plasmis	PlasF	Chrom DB	Plasm DB	Ttest	N° contigs	Tamaños	N° contigs Chrom
	NODE_20	1	1	1	1	1	5		103876	
	NODE_42	0	0	0	1	1	2		5552	
	NODE_40	0	1	0	1	1	3		6797	
	NODE_39	0	0	0	1	1	2		8314	
	NODE_45	1	1	1	0	1	4		2413	
	NODE_46	0	1	1	0	1	3		2076	
	NODE_41	0	0	1	1	1	3		6654	
	NODE_30	0	1	1	0	1	3		27691	
	NODE_18	0	0	1	1	0	2		121235	
	NODE_51	0	1	1	1	1	4		1375	
	NODE_49	0	1	0	0	1	2		1672	
	NODE_53	0	1	1	1	1	4	21	1200	35
	NODE_52	0	1	1	1	1	4		1303	
	NODE_36	0	0	1	1	1	3		19211	
	NODE_50	0	0	1	1	1	3		1571	
	NODE_54	1	1	1	0	1	4		1113	
	NODE_47	0	1	1	0	1	3		2028	
	NODE_56	0	1	1	1	1	4		1031	
	NODE_38	0	1	1	0	1	3		10532	
	NODE_22	0	1	1	0	1	3		77820	
	NODE_29	0	1	0	1	0	2		29666	
	NODE_18	0	0	1	1	0	2		121236	
	NODE_49	1	1	1	1	1	5		1677	
	NODE_59	1	0	0	0	1	2		1002	
	NODE_40	0	0	1	0	1	2		10532	
	NODE_53	1	0	0	1	1	3		1303	
	NODE_51	0	0	1	1	1	3		1571	
	NODE_42	0	0	0	1	1	2		6797	
	NODE_50	0	0	1	1	0	2	22	1655	37
	NODE_43	1	1	1	1	1	5		4950	
	NODE_44	1	0	1	0	1	3		4640	
	NODE_52	1	0	1	0	0	2		1453	
	NODE_47	1	0	0	0	1	2		2328	
	NODE_27	1	1	0	1	1	4		36150	
	NODE_38	0	0	1	1	1	3		19201	
	NODE_41	0	0	1	0	1	2		9465	

GMR-RA953**GMR-RA1048**

Aislamiento	contig.id	Cover	plasmis	PlasF	Chrom DB	Plasm DB	Ttest	N° contigs	Tamaños	N° contigs Chrom
	NODE_66	0	0	1	1	0	2		2517	
	NODE_61	0	1	1	0	1	3		3696	
	NODE_56	0	1	1	0	1	3		4574	
	NODE_74	1	0	0	0	1	2		1345	
	NODE_77	1	1	1	0	1	4		1210	
	NODE_71	0	1	1	1	1	4		1570	
	NODE_79	0	1	0	1	0	2		1031	
	NODE_41	1	1	1	0	1	4		13621	
	NODE_64	0	1	1	0	1	3		2965	
	NODE_65	1	1	1	1	1	5		2770	
	NODE_39	0	1	1	1	1	4		16981	
	NODE_52	0	0	1	0	1	2		6312	
	NODE_60	0	1	1	0	1	3		4122	
	NODE_72	0	0	1	1	0	2		1548	
	NODE_59	0	1	0	1	1	3		4174	
	NODE_68	1	1	1	1	0	4		1929	
	NODE_40	0	1	0	1	1	3		14792	
	NODE_53	0	1	1	1	1	3		6047	
	NODE_32	0	1	1	1	1	4		29270	
	NODE_55	0	1	1	0	1	3		4639	
	NODE_62	0	1	1	0	0	2		3567	
	NODE_70	0	1	1	1	1	4		1753	
	NODE_16	0	1	1	1	0	3		115089	
	NODE_58	0	1	1	1	1	4		4319	
	NODE_67	1	0	0	0	1	2		1971	
	NODE_43	0	0	1	1	0	2		12393	
	NODE_33	0	1	1	1	1	4		24477	
	NODE_46	0	0	1	1	0	2		1655	
	NODE_14	0	1	1	1	0	3		132162	
	NODE_53	1	0	0	0	1	2		1113	
	NODE_44	1	1	1	0	1	4		2076	
	NODE_47	0	0	0	1	1	2		1572	
	NODE_48	0	0	1	1	1	3	17	1538	
	NODE_19	0	1	1	0	1	3		77776	36
	NODE_36	0	1	1	1	1	4		9192	
	NODE_38	0	1	0	1	1	3		6797	
	NODE_51	1	1	1	1	1	5		1196	

GMR-RA1151

GMR-RA1152

Aislamiento	contig.id	Cover	plasmid	PlasF	Chrom DB	Plasm DB	Ttest	N° contigs	Tamaños	N° contigs Chrom
	NODE_52	0	1	0	0	1	2		1162	
	NODE_42	0	0	1	1	1	3		2971	
	NODE_43	1	1	1	0	1	4		2592	
	NODE_50	1	0	0	1	1	3		1303	
	NODE_34	0	1	1	0	1	3		10532	
	NODE_39	0	0	1	1	1	3		6701	
	NODE_41	0	0	1	1	1	3		4126	
	NODE_69	1	0	0	0	1	2		1345	
	NODE_47	0	1	0	1	1	3		8099	
	NODE_60	0	0	1	1	1	3		1924	
	NODE_58	0	0	1	1	0	2		2517	
	NODE_63	0	0	1	1	1	3		1753	
	NODE_64	0	0	1	0	1	2		1667	
	NODE_37	0	0	1	1	1	3		16981	
	NODE_74	0	1	1	1	1	4		1001	
	NODE_34	0	0	1	1	1	3		23533	
	NODE_32	0	0	1	1	1	3		28777	
	NODE_53	0	1	1	0	1	3		3875	
	NODE_52	0	1	1	0	1	3		4574	
	NODE_14	0	1	1	1	0	3		115104	
	NODE_65	1	1	1	0	1	4		1578	
	NODE_44	0	0	1	1	0	2		9953	
	NODE_29	0	1	1	1	1	4		39936	44
	NODE_33	0	0	1	1	1	3		24269	
	NODE_66	0	0	1	1	0	2		1548	
	NODE_43	0	1	0	1	0	2		10384	
	NODE_45	0	1	1	0	1	3		9462	
	NODE_31	0	0	1	1	1	3		30618	
	NODE_41	0	0	1	1	1	3		11438	
	NODE_57	1	1	1	0	1	4		2583	
	NODE_62	1	0	0	0	1	2		1883	
	NODE_59	1	1	1	1	0	4		1929	
	NODE_56	1	1	1	1	1	5		2770	
	NODE_49	0	0	1	1	1	3		6791	
	NODE_70	0	1	1	0	0	2		1279	
	NODE_51	0	1	1	1	1	4		5178	
	NODE_61	0	0	1	1	1	3		1918	
								30		
										44

GMR-RA1152**GMR-RA1153**

Aislamiento	contig.id	Cover	plasmis	PlasF	Chrom DB	Plasm DB	Ttest	N° contigs	Tamaños	N° contigs Chrom
	NODE_49	0	0	0	1	1	2		1449	
	NODE_44	0	1	1	1	0	3		2539	
	NODE_45	1	0	1	1	1	4		2204	
	NODE_56	0	0	1	1	0	2		1096	
	NODE_43	1	1	1	1	1	5		2596	
	NODE_42	0	1	0	1	0	2		2793	
	NODE_24	0	0	1	1	1	3		43602	
	NODE_46	0	1	0	1	0	2		2075	
	NODE_57	0	1	1	1	1	4		1375	
	NODE_61	1	0	0	0	1	2		1113	
	NODE_39	0	0	1	0	1	2		10532	
	NODE_48	1	0	1	0	1	3		2076	
	NODE_40	0	0	0	1	1	2		8314	35
	NODE_22	0	1	1	0	1	3	27	77820	
	NODE_52	0	0	1	1	1	3		1677	
	NODE_18	0	0	1	1	0	2		121405	
	NODE_55	0	0	0	1	1	2		1571	
	NODE_49	0	0	1	0	1	2		2028	
	NODE_43	0	0	1	1	1	3		5300	
	NODE_56	0	1	1	1	1	4		1441	
	NODE_38	0	1	1	1	1	4		19204	
	NODE_42	0	0	0	1	1	2		5553	
	NODE_62	0	0	1	1	1	3		1030	
	NODE_29	1	1	0	1	1	4		36150	
	NODE_54	1	0	1	0	1	3		1595	
	NODE_20	0	1	0	1	0	2		88658	
	NODE_58	1	0	1	1	1	4		1303	
	NODE_59	0	0	1	1	1	3		1200	
	NODE_33	0	0	1	0	1	2		27690	
	NODE_60	0	1	0	0	1	2		1162	
	NODE_53	0	0	1	1	0	2		1655	
	NODE_41	0	0	0	1	0	2		6797	
	NODE_25	0	0	1	1	1	3		60101	
	NODE_45	1	1	1	1	1	5		4950	
	NODE_47	0	1	1	0	1	3		2923	

GMR-RA13616**GMR-RA22216**

Aislamiento	contig.id	Cover	plasmis	PlasF	Chrom DB	Plasm DB	Ttest	N° contigs	Tamaños	N° contigs Chrom
	NODE_33	0	1	1	1	1	4		24269	
	NODE_46	0	1	0	1	1	3		6541	
	NODE_25	0	1	1	1	1	4		46021	
	NODE_20	0	1	1	1	1	4		88805	
	NODE_68	1	1	1	1	1	5		1087	
	NODE_52	0	1	1	0	1	3		3698	
	NODE_15	0	1	1	1	0	3		115089	
	NODE_49	0	1	1	0	1	3		4639	
	NODE_59	0	1	1	1	0	3		1929	
	NODE_64	1	1	0	0	1	3		1345	
	NODE_69	0	1	1	1	1	4		1008	
	NODE_38	0	1	1	0	1	3		13621	
	NODE_62	0	1	1	1	1	4		1570	
	NODE_61	0	1	1	0	0	2		1643	
	NODE_47	0	1	1	0	1	3	27	6311	42
	NODE_60	0	1	1	1	1	4		1645	
	NODE_53	0	1	1	1	1	4		3278	
	NODE_67	0	1	1	0	1	3		1210	
	NODE_43	0	1	0	1	1	3		10484	
	NODE_55	1	1	1	1	1	5		2770	
	NODE_54	0	1	1	0	1	3		2966	
	NODE_65	0	1	1	0	1	3		1297	
	NODE_36	0	1	1	1	0	3		20938	
	NODE_48	0	1	0	1	1	3		6113	
	NODE_50	0	1	0	1	1	3		4322	
	NODE_58	1	1	0	0	1	3		1971	
	NODE_37	0	1	1	1	1	4		20879	
	NODE_28	1	1	0	1	1	4		1952	
	NODE_24	1	1	1	1	1	5		2770	
	NODE_14	0	0	1	1	1	3		90201	
	NODE_20	0	0	1	0	1	2		9455	
	NODE_35	1	1	1	1	1	5	19	1115	18
	NODE_37	0	0	1	0	1	2		1022	
	NODE_36	1	1	1	0	1	4		1065	
	NODE_29	0	0	1	0	1	2		1923	
	NODE_16	0	0	1	1	1	3		54195	
	NODE_23	1	1	0	0	0	2		2800	

GMR-RA38516

GMR-RA42816

Aislamiento	contig.id	Cover	plasmid	PlasF	Chrom DB	Plasm DB	Ttest	N° contigs	Tamaños	N° contigs Chrom
GMR-RA42816	NODE_18_	0	0	0	1	1	2		20488	
	NODE_22	0	0	1	1	1	3		2877	
	NODE_19	0	0	1	1	1	3		13808	
	NODE_33	1	0	0	0	1	2		1354	
	NODE_30	0	0	1	1	1	3		1879	
	NODE_34	1	0	0	0	1	2		1271	
	NODE_32	0	0	0	1	1	2		1711	
	NODE_31	0	0	1	0	1	2		1721	
	NODE_26	0	0	1	0	1	2		2300	
	NODE_28	0	1	1	1	0	3		43579	
	NODE_64	1	0	0	0	1	2		1345	
	NODE_44	0	1	1	1	1	3		11562	
	NODE_55	0	0	1	1	0	2		3640	
	NODE_51	0	0	0	1	0	2		8311	
	NODE_47	0	1	1	0	1	3		10698	
	NODE_54	0	0	0	1	1	2		7777	
	NODE_39	0	0	0	1	0	2		14606	
	NODE_35	0	1	1	1	1	4		18258	
	NODE_37	0	1	1	0	1	3		17393	
	NODE_50	0	1	1	1	1	4		9914	
	NODE_65	0	1	0	0	1	3	22	1342	46
	NODE_56	0	0	0	1	1	2		3215	
	NODE_62	1	0	0	0	0	2		1547	
	NODE_43	0	0	0	0	1	3		11974	
	NODE_32	0	1	1	1	1	4		24519	
	NODE_58	1	1	1	1	1	5		2770	
	NODE_68	1	1	1	1	1	5		1194	
	NODE_30	0	1	1	1	1	4		34073	
	NODE_34	0	1	0	0	1	3		21440	
	NODE_61	0	1	1	1	0	3		2373	
	NODE_59	0	1	1	1	1	4		2494	
	NODE_23	0	1	0	0	1	2		3647	
	NODE_30	0	1	1	1	0	3		1669	
NODE_32	1	1	0	0	1	4	17	1224	17	
NODE_14	0	1	1	1	1	4		53984		
NODE_33	0	1	1	1	0	3		1065		

Aislamiento	contig.id	Cover	plasmIS	PlasF	Chrom DB	Plasm DB	Ttest	N° contigs	Tamaños	N° contigs Chrom
GMR-RA46616	NODE_28	0	1	1	0	1	3		1721	
	NODE_19	0	1	1	0	1	3		16691	
	NODE_18	0	1	1	1	1	4		17288	
	NODE_16	0	1	0	1	1	3		25656	
	NODE_31	1	0	0	0	1	2		1271	
	NODE_34	0	1	0	0	1	2		1022	
	NODE_25	1	1	1	1	1	5		2770	
	NODE_12	0	1	1	1	1	4		90201	
	NODE_21	0	0	1	1	1	3		4320	
	NODE_27	0	1	0	1	1	3		1952	
	NODE_29	0	1	0	1	1	3		1711	
	NODE_22	0	1	1	0	1	3		3736	
	NODE_44	1	1	1	1	0	4		1813	
	NODE_46	1	0	1	0	0	2		1441	
	NODE_36	1	0	1	0	1	3		14606	
	NODE_23	1	1	0	1	0	3		64898	
GMR-RA44516	NODE_48	1	0	0	0	1	2	10	1345	40
	NODE_45	1	0	0	0	1	2		1459	
	NODE_49	1	0	1	0	0	2		1279	
	NODE_25	0	0	1	1	1	3		59033	
	NODE_34	0	0	1	1	0	2		19204	
	NODE_30	0	0	1	1	1	3		41478	

Anexo E

Scripts

Script 1 - Construcción del pipeline: El *script* se encuentra en el servidor del centro de investigación bioinformática, cuya IP es 168.176.54.15. En el directorio: Vault2/homehpc.

Referencias

- Abdallah, M. and Balshi, A. (2018). First literature review of carbapenem-resistant providencia. *New microbes and new infections*, 25:16–23.
- Abeles, A. L., Snyder, K. M., and Chatteraj, D. K. (1984). P1 plasmid replication: replicon structure. *Journal of molecular biology*, 173(3):307–324.
- Achtman, M., Kennedy, N., and Skurray, R. (1977). Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: role of traT protein in surface exclusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11):5104–5108.
- Achtman, M., Morelli, G., and Schwuchow, S. (1978). Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: role of F pili and fate of mating aggregates. *Journal of bacteriology*, 135(3):1053–1061.
- Ah-Seng, Y., Lopez, F., Pasta, F., Lane, D., and Bouet, J.-Y. (2009). Dual role of DNA in regulating ATP hydrolysis by the SopA partition protein. *Journal of Biological Chemistry*, 284(44):30067–30075.
- Aibinu, I. E., Pfeifer, Y., Ogunsola, F., Odugbemi, T., Koenig, W., and Ghebremedhin, B. (2011). Emergence of β -lactamases OXA-10, VEB-1 and CMY in providencia spp. from nigeria. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(8):1931–1932.
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V., Cheng, A. A., Liu, S., et al. (2019). CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, 48(D1):D517–D525.
- Anderson, C., Johnson, T., Case, C., Cappuccino, J., and Sherman, N. (2013). Great adventures in the microbiology laboratory.
- Antipov, D., Hartwick, N., Shen, M., Raiko, M., Lapidus, A., and Pevzner, P. (2016). plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. *bioRxiv*, page 048942.
- Antunes, N. and Fisher, J. (2014). Acquired class D beta-lactamases. *antibiotics (basel)* 3: 398–434.

- Arredondo-Alonso, S., Willems, R. J., van Schaik, W., and Schürch, A. C. (2017). On the (im) possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. *Microbial genomics*, 3(10).
- Aschbacher, R., Doumith, M., Livermore, D. M., Larcher, C., and Woodford, N. (2008). Linkage of acquired quinolone resistance (*qnrS1*) and metallo- β -lactamase (*bla* VIM-1) genes in multiple species of *Enterobacteriaceae* from bolzano, italy. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61(3):515–523.
- Aubert, D., Poirel, L., Ben Ali, A., Goldstein, F. W., and Nordmann, P. (2001). OXA-35 is an OXA-10-related β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(5):717–721.
- Bae, I. K., Lee, Y.-N., Hwang, H. Y., Jeong, S. H., Lee, S. J., Kwak, H.-S., Song, W., Kim, H. J., and Youn, H. (2006). Emergence of CTX-M-12 extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(6):1257–1259.
- Bahar, G., Eraç, B., Mert, A., and Gülay, Z. (2004). PER-1 production in a urinary isolate of *Providencia rettgeri*. *Journal of chemotherapy*, 16(4):343–346.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, 19(5):455–477.
- Barl, P., Bedenić, B., Sardelić, S., Uzunović, S., Vraneš, J., and Plečko, V. (2012). Spread of CTX-M-15 positive *Providencia spp* causing urinary tract infections in university hospital split in croatia. *Medicinski Glasnik*, 9(2):317.
- Barrios, H., Garza-Ramos, U., Reyna-Flores, F., Sanchez-Perez, A., Rojas-Moreno, T., Garza-Gonzalez, E., Llaca-Diaz, J. M., Camacho-Ortiz, A., Guzmán-López, S., and Silva-Sanchez, J. (2013). Isolation of carbapenem-resistant NDM-1-positive *Providencia rettgeri* in mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8):1934–1936.
- Bimboim, H. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, 7(6):1513–1523.
- Bocanegra-Ibarias, P., Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Barrios, H., Villarreal-Treviño, L., Rodríguez-Noriega, E., Garza-Ramos, U., Petersen-Morfin, S., and Silva-Sanchez, J. (2017). Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying *Enterobacteriaceae* in mexico. *PloS one*, 12(6):e0179651.
- Bossart, J. and Prowell, D. P. (1998). Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(5):202–206.
- Bramhill, D. and Kornberg, A. (1988). Duplex opening by dnaA protein at novel sequences in initiation of replication at the origin of the *E. coli* chromosome. *Cell*, 52(5):743–755.

- Briñas, L., Zarazaga, M., Sáenz, Y., Ruiz-Larrea, F., and Torres, C. (2002). β -lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(10):3156–3163.
- Bukhari, A. I., Shapiro, J. A., Adhya, S. L., et al. (1977). DNA insertion elements, plasmids, and episomes. In *DNA Insertions Meeting (1976: Cold Spring Harbor Laboratory)*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Bush, K. (2013). The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19(4):549–559.
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F. M., and Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(7):3895–3903.
- Carmo Junior, N. V. d., Ferreira Filho, H., Calvalcante, A. J. W., Garcia, D. d. O., Furtado, J. J. D., et al. (2015). First report of a NDM-producing *Providencia rettgeri* strain in the state of são paulo. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 19(6):675–676.
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M.-A., Barrrell, B. G., and Parkhill, J. (2005). Act: the artemis comparison tool. *Bioinformatics*, 21(16):3422–3423.
- Castañeda, J., Gómez, K., Corrales, L., and Cortés, S. (2016). Perfil de resistencia a antibióticos en bacterias que presentan la enzima ndm-1 y sus mecanismos asociados: una revisión sistemática. *Nova*, 14(25):95–111.
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., and Aarestrup, F. M. (2009). qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar kentucky and bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(2):603–608.
- Chander, Y., Goyal, S. M., and Gupta, S. C. (2006). Antimicrobial resistance of *Providencia spp.* isolated from animal manure. *The Veterinary Journal*, 172(1):188–191.
- Chikhi, R. and Medvedev, P. (2013). Informed and automated k-mer size selection for genome assembly. *Bioinformatics*, 30(1):31–37.
- Choi, H. K., Kim, Y. K., Kim, H. Y., Park, J. E., and Uh, Y. (2015). Clinical and microbiological features of providencia bacteremia: experience at a tertiary care hospital. *The Korean journal of internal medicine*, 30(2):219.
- Chun, J. and Rainey, F. A. (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the bacteria and archaea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(2):316–324.
- Cloud, J. L., Harmsen, D., Iwen, P. C., Dunn, J. J., Hall, G., LaSala, P. R., Hoggan, K., Wilson, D., Woods, G. L., and Mellmann, A. (2010). Comparison of traditional phenotypic identification methods with partial 5' 16s rRNA gene sequencing for species-level identification of nonfermenting gram-negative bacilli. *Journal of clinical microbiology*, 48(4):1442–1444.
- Conlan, S., Thomas, P. J., Deming, C., Park, M., Lau, A. F., Dekker, J. P., Snitkin, E. S., Clark, T. A., Luong, K., Song, Y., et al. (2014).

- Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Science translational medicine*, 6(254):254ra126–254ra126.
- Curtis, H. and Schnek, A. (2008). *Curtis. Biología*. Ed. Médica Panamericana.
- Curtiss III, R. (1969). Bacterial conjugation. *Annual review of microbiology*, 23(1):69–136.
- De Toro, M., Garcillán-Barcia, M. P., and De La Cruz, F. (2015). Plasmid diversity and adaptation analyzed by massive sequencing of *Escherichia coli* plasmids. In *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, pages 219–235. American Society of Microbiology.
- Dery, K. J., Chavideh, R., Waters, V., Chamorro, R., Tolmasky, L. S., and Tolmasky, M. E. (1997). Characterization of the replication and mobilization regions of the multiresistance *Klebsiella pneumoniae* plasmid pJHCMW1. *Plasmid*, 38(2):97–105.
- Dib, J. R., Wagenknecht, M., Farías, M. E., and Meinhardt, F. (2015). Strategies and approaches in plasmidome studies—uncovering plasmid diversity disregarding of linear elements? *Frontiers in microbiology*, 6:463.
- Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillán-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C., and de la Cruz, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS microbiology reviews*, 28(1):79–100.
- Galac, M. R. and Lazzaro, B. P. (2012). Comparative genomics of bacteria in the genus *Providencia* isolated from wild *Drosophila melanogaster*. *BMC genomics*, 13(1):612.
- Gao, H., Liu, Y., Wang, R., Wang, Q., Jin, L., and Wang, H. (2020). The transferability and evolution of NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* from clinical settings. *EBioMedicine*, 51:102599.
- Gerdes, K., Møller-Jensen, J., and Jensen, R. B. (2000). Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. *Molecular microbiology*, 37(3):455–466.
- Gibson, M. K., Forsberg, K. J., and Dantas, G. (2015). Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *The ISME journal*, 9(1):207.
- Gordon, E., Mouz, N., Duee, E., and Dideberg, O. (2000). The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: implication in drug resistance. *Journal of molecular biology*, 299(2):477–485.
- Guglielmini, J., de La Cruz, F., and Rocha, E. P. (2012). Evolution of conjugation and type IV secretion systems. *Molecular biology and evolution*, 30(2):315–331.
- Guillard, T., Cambau, E., Neuwirth, C., Nenninger, T., Mbadi, A., Brasme, L., Vernet-Garnier, V., Bajolet, O., and de Champs, C. (2012). Description of a 2,683-base-pair plasmid containing *qnrD* in two *Providencia rettgeri* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(1):565–568.

- Gupta, R. S. (2016). Impact of genomics on the understanding of microbial evolution and classification: the importance of darwin's views on classification. *FEMS microbiology reviews*, 40(4):520–553.
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., and Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8):1072–1075.
- Hadfield, J., Croucher, N. J., Goater, R. J., Abudahab, K., Aanensen, D. M., and Harris, S. R. (2018). Phandango: an interactive viewer for bacterial population genomics. *Bioinformatics*, 34(2):292–293.
- Hayes, W. (1952). Recombination in bact. coil K 12: Unidirectional transfer of genetic material. *Nature*, 169(4290):118.
- Hayes, W. (1953). Observations on a transmissible agent determining sexual differentiation in *Bacterium coli*. *Microbiology*, 8(1):72–88.
- Henz, S. R., Huson, D. H., Auch, A. F., Nieselt-Struwe, K., and Schuster, S. C. (2005). Whole-genome prokaryotic phylogeny. *Bioinformatics*, 21(10):2329–2335.
- Hong, J. S., Yoon, E.-J., Song, W., Seo, Y. B., Shin, S., Park, M.-J., Jeong, S. H., and Lee, K. (2018). Molecular characterization of *Pseudomonas putida* group isolates carrying *blaVIM-2* disseminated in a university hospital in korea. *Microbial Drug Resistance*, 24(5):627–634.
- Hu, H., Hu, Y., Pan, Y., Liang, H., Wang, H., Wang, X., Hao, Q., Yang, X., Yang, X., Xiao, X., et al. (2012). Novel plasmid and its variant harboring both a *blaNDM-1* gene and type IV secretion system in clinical isolates of *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4):1698–1702.
- Hyatt, D., Chen, G.-L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., and Hauser, L. J. (2010). Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 11(1):119.
- Jaffe, A., Ogura, T., and Hiraga, S. (1985). Effects of the *ccd* function of the F plasmid on bacterial growth. *Journal of bacteriology*, 163(3):841–849.
- Johnson, A. P. and Woodford, N. (2013). Global spread of antibiotic resistance: the example of new delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of medical microbiology*, 62(4):499–513.
- Jolley, K. A., Bray, J. E., and Maiden, M. C. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the pubMLST. org website and their applications. *Wellcome open research*, 3.
- Kariuki, S., Corkill, J., Revathi, G., Musoke, R., and Hart, C. (2001). Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from kenya. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(7):2141–2143.
- Kim, D., Song, L., Breitwieser, F. P., and Salzberg, S. L. (2016). Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome research*, 26(12):1721–1729.
- King, D. and Strynadka, N. (2011). Crystal structure of new delhi metallo- β -lactamase reveals molecular basis for antibiotic resistance. *Protein Science*, 20(9):1484–1491.

- Kolbe, D. L. and Eddy, S. R. (2011). Fast filtering for RNA homology search. *Bioinformatics*, 27(22):3102–3109.
- Koneman, E., Meeroff, N. G., Roel, B. E., et al. (1997). *Diagnóstico microbiológico: texto y atlas color*.
- Krawczyk, P. S., Lipinski, L., and Dziembowski, A. (2018). PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. *Nucleic acids research*, 46(6):e35–e35.
- Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C. G., Irfan, S., et al. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in india, pakistan, and the uk: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet infectious diseases*, 10(9):597–602.
- Lachish, T., Elimelech, M., Arieli, N., Adler, A., Rolain, J.-M., and Assous, M. V. (2012). Emergence of new delhi metallo- β -lactamase in jerusalem, israel. *International journal of antimicrobial agents*, 40(6):566–567.
- Lachmayr, K. L., Kerkhof, L. J., DiRienzo, A. G., Cavanaugh, C. M., and Ford, T. E. (2009). Quantifying nonspecific TEM β -lactamase (*blaTEM*) genes in a wastewater stream. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(1):203–211.
- Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E. A., Stærfeldt, H.-H., Rognes, T., and Ussery, D. W. (2007). RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal rna genes. *Nucleic acids research*, 35(9):3100–3108.
- Laslett, D. and Canback, B. (2004). ARAGORN, a program to detect trna genes and tmrna genes in nucleotide sequences. *Nucleic acids research*, 32(1):11–16.
- Lederberg, J., Cavalli, L. L., and Lederberg, E. M. (1952). Sex compatibility in *Escherichia coli*. *Genetics*, 37(6):720.
- Lederberg, J. and Tatum, E. L. (1946a). Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature*, 158(4016):558–558.
- Lederberg, J. and Tatum, E. L. (1946b). Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, volume 11, pages 113–114. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Liebert, C. A., Hall, R. M., and Summers, A. O. (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(3):507–522.
- Livermore, D. (1991). Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis*, 78(Supl):7–16.
- López De Heredia Larrea, U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales*, 64:7–31.
- Lynch, A. S. (2006). Efflux systems in bacterial pathogens: an opportunity for therapeutic intervention? an industry view. *Biochemical pharmacology*, 71(7):949–956.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R., Carmeli, Y., Falagas, M., Giske, C., Harbarth, S., Hindler, J., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drugresistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard

- definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, 18(3):268–281.
- Mahrouki, S., Chihi, H., Bourouis, A., Ayari, K., Ferjani, M., Moussa, M. B., and Belhadj, O. (2015). Nosocomial dissemination of plasmids carrying *bla*TEM-24, *bla*DHA-1, *aac*(6')-Ib-cr, and *qnrA6* in *Providencia spp.* strains isolated from a tunisian hospital. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 81(1):50–52.
- Manos, J. and Belas, R. (2006). The genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*, pages 245–269.
- Marchetti, M. L., Errecalde, J. O., and Mestorino, O. N. (2011). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. *Analecta Veterinaria*, 31.
- Marquez-Ortiz, R. A., Haggerty, L., Olarte, N., Duarte, C., Garza-Ramos, U., Silva-Sanchez, J., Castro, B. E., Sim, E. M., Beltran, M., Moncada, M. V., et al. (2017a). Genomic epidemiology of NDM-1-encoding plasmids in latin american clinical isolates reveals insights into the evolution of multidrug resistance. *Genome biology and evolution*, 9(6):1725–1741.
- Marquez-Ortiz, R. A., Haggerty, L., Sim, E. M., Duarte, C., Castro-Cardozo, B. E., Beltran, M., Saavedra, S., Vanegas, N., Escobar-Perez, J., and Petty, N. K. (2017b). First complete *Providencia rettgeri* genome sequence, the NDM-1-producing clinical strain rb151. *Genome Announc.*, 5(3):e01472–16.
- Martinez-Martinez, L. (2007). Association of ESBL with other resistance mechanisms. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 25(Suppl 2):38–47.
- Marvin, D. and Hohn, B. (1969). Filamentous bacterial viruses. *Bacteriological reviews*, 33(2):172.
- Mataseje, L., Boyd, D., Lefebvre, B., Bryce, E., Embree, J., Gravel, D., Katz, K., Kibsey, P., Kuhn, M., Langley, J., et al. (2013). Complete sequences of a novel *bla*NDM-1-harboring plasmid from *Providencia rettgeri* and an FII-type plasmid from *Klebsiella pneumoniae* identified in canada. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(3):637–642.
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M. J., De Pascale, G., Ejim, L., et al. (2013). The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(7):3348–3357.
- Mitsuyama, J., Hiruma, R., Yamaguchi, A., and Sawai, T. (1987). Identification of porins in outer membrane of *Proteus*, *Morganella*, and *Providencia spp.* and their role in outer membrane permeation of beta-lactams. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 31(3):379–384.
- Montealegre, M., Correa, A., Briceno, D., Rosas, N., De La Cadena, E., Ruiz, S., Mojica, M., Camargo, R., Zuluaga, I., Marín, A., Quinn, J., and Villegas, M. (2011). Novel VIM metallo- β -lactamase variant, VIM-24, from a *Klebsiella pneumoniae* isolate from colombia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55:2428–30.

- Müller, H. (1986). Occurrence and pathogenic role of morganella-proteus-providencia group bacteria in human feces. *Journal of clinical microbiology*, 23(2):404–405.
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., and Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y microbiología clínica*, 29(7):524–534.
- Nordmann, P., Naas, T., and Poirel, L. (2011a). Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging infectious diseases*, 17(10):1791.
- Nordmann, P., Poirel, L., Toleman, M. A., and Walsh, T. R. (2011b). Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by gram-negative bacteria? *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(4):689–692.
- Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T. R., and Livermore, D. M. (2011c). The emerging NDM carbapenemases. *Trends in microbiology*, 19(12):588–595.
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiological reviews*, 51(4):381.
- Ogura, T. and Hiraga, S. (1983). Partition mechanism of f plasmid: two plasmid gene-encoded products and a cis-acting region are involved in partition. *Cell*, 32(2):351–360.
- O’Hara, C. M., Brenner, F. W., and Miller, J. M. (2000). Classification, identification, and clinical significance of proteus, providencia, and morganella. *Clinical microbiology reviews*, 13(4):534–546.
- Olaitan, A. O., Diene, S. M., Assous, M. V., and Rolain, J.-M. (2015). Genomic plasticity of multidrug-resistant NDM-1 positive clinical isolate of *Providencia rettgeri*. *Genome biology and evolution*, 8(3):723–728.
- Otlu, B., Yakupoğulları, Y., Gürsoy, N., Duman, Y., Bayındır, Y., Tekereköglü, M., and Ersoy, Y. (2018). Co-production of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases in *Providencia rettgeri*: the first report. *Mikrobiyoloji bülteni*, 52(3):300–307.
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., and Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22):3691–3693.
- Pasquali, F., Kehrenberg, C., Manfreda, G., and Schwarz, S. (2005). Physical linkage of tn 3 and part of Tn 1721 in a tetracycline and ampicillin resistance plasmid from *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(4):562–565.
- Pasteran, F., Meo, A., Gomez, S., Derdoy, L., Albronz, E., Faccione, D., Guerriero, L., Archuby, D., Tarzia, A., López, M., et al. (2014). Emergence of genetically related NDM-1-producing *Providencia rettgeri* strains in argentina. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2(4):344.
- Patel, G. and Bonomo, R. (2013). “stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Frontiers in microbiology*, 4:48.

- Pavel, A. B. and Vasile, C. I. (2012). PyElph-a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC bioinformatics*, 13(1):9.
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods*, 8(10):785.
- Pfeifer, Y., Cullik, A., and Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(6):371–379.
- Philippon, A., Arlet, G., and Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(1):1–11.
- Poirel, L., Gniadkowski, M., and Nordmann, P. (2002). Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(6):1031–1034.
- Queenan, A. M. and Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20(3):440–458.
- Rasheed, J. K., Kitchel, B., Zhu, W., Anderson, K. F., Clark, N. C., Ferraro, M. J., Savard, P., Humphries, R. M., Kallen, A. J., and Limbago, B. M. (2013). New delhi metallo- β -lactamase-producing enterobacteriaceae, united states. *Emerging infectious diseases*, 19(6):870.
- Recchia, G. D. and Sherratt, D. J. (2002). Gene acquisition in bacteria by integron-mediated site-specific recombination. In *Mobile DNA II*, pages 162–176. American Society of Microbiology.
- Revilla, C., Garcillán-Barcia, M. P., Fernández-López, R., Thomson, N. R., Sanders, M., Cheung, M., Thomas, C. M., and de la Cruz, F. (2008). Different pathways to acquiring resistance genes illustrated by the recent evolution of IncW plasmids. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4):1472–1480.
- Robicsek, A., Jacoby, G. A., and Hooper, D. C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet infectious diseases*, 6(10):629–640.
- Rojas, L. J., Wright, M. S., De La Cadena, E., Mota, G., Hujer, K. M., Villegas, M. V., Adams, M. D., and Bonomo, R. A. (2016). Initial assessment of the molecular epidemiology of *bla*NDM-1 in colombia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(7):4346–4350.
- Rojas, S.-Y. S., Duarte, C., de Arias, M. N. G., and Ovalle, M. V. (2017). Emergencia de *Providencia rettgeri* NDM-1 en dos departamentos de colombia, 2012-2013. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 35(6):358–358.
- Royer, G., Decousser, J., Branger, C., Dubois, M., Médigue, C., Denamur, E., and Vallenet, D. (2018). Plascope: a targeted approach to assess the plasmidome from genome assemblies at the species level. *Microbial genomics*, 4(9).

- Rozov, R., Brown Kav, A., Bogumil, D., Shterzer, N., Halperin, E., Mizrahi, I., and Shamir, R. (2017). Recycler: an algorithm for detecting plasmids from de novo assembly graphs. *Bioinformatics*, 33(4):475–482.
- Sagar, S., Narasimhaswamy, N., and d'Souza, J. (2017). *Providencia Rettgeri*: An emerging nosocomial uropathogen in an indwelling urinary catheterised patient. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 11(6):DD01.
- Saier JR, M. H., Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Pao, S. S., Skurray, R. A., and Nikaïdo, H. (1998). Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *The FASEB Journal*, 12(3):265–274.
- Schechter, L. M., Creely, D. P., Garner, C. D., Shortridge, D., Nguyen, H., Chen, L., Hanson, B. M., Sodergren, E., Weinstock, G. M., Dunne, W. M., et al. (2018). Extensive gene amplification as a mechanism for piperacillin-tazobactam resistance in *Escherichia coli*. *MBio*, 9(2):e00583–18.
- Schloss, J. A. (2008). How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nature biotechnology*, 26(10):1113.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14):2068–2069.
- Sekezuka, T., Matsui, M., Yamane, K., Takeuchi, F., Ohnishi, M., Hishinuma, A., Arakawa, Y., and Kuroda, M. (2011). Complete sequencing of the blaNDM-1-positive IncA/C plasmid from *Escherichia coli* ST38 isolate suggests a possible origin from plant pathogens. *PLoS one*, 6(9).
- Sharma, D., Sharma, P., and Soni, P. (2017). First case report of *Providencia Rettgeri* neonatal sepsis. *BMC research notes*, 10(1):536.
- Shin, S., Jeong, S. H., Lee, H., Hong, J. S., Park, M.-J., and Song, W. (2018). Emergence of multidrug-resistant *Providencia rettgeri* isolates co-producing NDM-1 carbapenemase and PER-1 extended-spectrum β -lactamase causing a first outbreak in Korea. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 17(1):20.
- Smalla, K., Jechalke, S., and Top, E. M. (2015). Plasmid detection, characterization and ecology. *Microbiology spectrum*, 3(1).
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., and de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74(3):434–452.
- Smith, D., Johnson, J., Harris, A., Furuno, J., Perencevich, E., and Morris Jr, J. (2003). Assessing risks for a pre-emergent pathogen: virginiamycin use and the emergence of streptogramin resistance in *Enterococcus faecium*. *The Lancet infectious diseases*, 3(4):241–249.
- Summers, D. K. and Sherratt, D. J. (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*, 36(4):1097–1103.
- Syvanen, M. and Kado, C. I. (2001). *Horizontal gene transfer*. Academic Press.
- Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Dahal, R. K., Sah, M. K., Ohara, H., Shimada, K., Kirikae, T., and Pokhrel, B. M. (2014). NDM-1 metallo- β -lactamase

- and arma 16s rRNA methylase producing *Providencia rettgeri* clinical isolates in Nepal. *BMC infectious diseases*, 14(1):56.
- Tafur, J. D., Torres, J. A., and Villegas, M. V. (2011). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas. *Infectio*, 12(3).
- Tatusova, T., Ciufu, S., Fedorov, B., O'Neill, K., and Tolstoy, I. (2014). RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy. *Nucleic acids research*, 42(D1):D553–D559.
- Toleman, M., Spencer, J., Jones, L., and Walsh, T. R. (2012). *bla*NDM-1 is a chimera likely constructed in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(5):2773–2776.
- Tolmasky, M. and Alonso, J. C. (2015). *Plasmids: biology and impact in biotechnology and discovery*. ASM Press.
- Tran, J. H. and Jacoby, G. A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8):5638–5642.
- Tran, T., Sherratt, D. J., and Tolmasky, M. E. (2010). *fpr*, a deficient Xer recombination site from a salmonella plasmid, fails to confer stability by dimer resolution: comparative studies with the pJHCMW1 *mwr* site. *Journal of bacteriology*, 192(3):883–887.
- Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., Van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., and Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature biotechnology*, 28(5):511.
- Tumbarello, M., Citton, R., Spanu, T., Sanguinetti, M., Romano, L., Fadda, G., and Cauda, R. (2004). ESBL-producing multidrug resistant *Providencia stuartii* infections in a university hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2):277–282.
- Van den Bogaard, A., London, N., Driessen, C., and Stobberingh, E. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(6):763–771.
- Vielva, L., de Toro, M., Lanza, V. F., and de la Cruz, F. (2017). PLACNETw: a web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics*, 33(23):3796–3798.
- Vignoli, R. and Seija, V. (2007). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Temas De Bacteriología Y Virología Médica*, cap, 35:649–662.
- Voor, A. F., Severin, J. A., Hagenaars, M. B., de Goeij, I., Gommers, D., Vos, M. C., et al. (2018). VIM-positive *Pseudomonas aeruginosa* in a large tertiary care hospital: matched case-control studies and a network analysis. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7(1):32.
- Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M., and Toleman, M. A. (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the new delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet infectious diseases*, 11(5):355–362.

- Wang, G.-H. and Brucker, R. M. (2019). Genome sequence of *Providencia rettgeri* nvit03, isolated from *Nasonia vitripennis*. *Microbiology resource announcements*, 8(3).
- White, P. A., McIver, C. J., and Rawlinson, W. D. (2001). Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(9):2658–2661.
- WHO (2018). Resistencia a los antibióticos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>. Accedido 29-08-2019.
- Woodford, N., Turton, J. F., and Livermore, D. M. (2011). Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 35(5):736–755.
- Wray, C. and Wray, A. (2000). *Salmonella in domestic animals*. Cabi.
- Wu, P.-J., Shannon, K., and Phillips, I. (1995). Mechanisms of hyperproduction of TEM-1 β -lactamase by clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36(6):927–939.
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., and Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla*NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(12):5046–5054.
- Zhao, J., Chen, Z., Chen, S., Deng, Y., Liu, Y., Tian, W., Huang, X., Wu, C., Sun, Y., Sun, Y., et al. (2010). Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(10):4219–4224.
- Zhao, W.-H. and Hu, Z.-Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in gram-negative bacteria. *Critical reviews in microbiology*, 39(1):79–101.
- Zhou, F. and Xu, Y. (2010). cBar: a computer program to distinguish plasmid-derived from chromosome-derived sequence fragments in metagenomics data. *Bioinformatics*, 26(16):2051–2052.
- Zurita, J., Parra, H., Gestal, M. C., McDermott, J., and Barba, P. (2015). First case of NDM-1-producing *Providencia rettgeri* in Ecuador. *Journal of global antimicrobial resistance*, 4(3):302–303.