UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia a antibióticos betalactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri* durante el período 2015 – 2016

Leidy Adriana Piza Buitrago

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Posgrado de Interfacultades
Bogotá, Colombia
2019

Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia a antibióticos betalactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri* durante el período 2015 – 2016

Leidy Adriana Piza Buitrago

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

Magister en Ciencias - Microbiología

Director (a):

Ph.D. Verónica del Pilar Rincón Forero

Codirector (a):

MSc. María Teresa Jesús Reguero Reza

Línea de Investigación:

Biología Molecular de Agentes Infecciosos

Grupos de Investigación:

Bioinformática y Epidemiología Molecular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades

Bogotá, Colombia

2019

Análisis comparativo de los elementos genómicos de resistencia a antibióticos betalactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri* durante el período 2015 – 2016

Leidy Adriana Piza Buitrago

Proyecto financiado

División de investigación de Bogotá (DIB) Proyecto 35030

Colciencias: Es Tiempo de Volver: Convocatoria 656, 2014

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Posgrado Interfacultades

Bogotá, Colombia

2019

«El conocimiento no es una vasija que se llena, sino un fuego que se enciende». Plutarco

Agradecimientos

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos que corresponden al trabajo en equipo de grandes profesionales, con esto quiera hacer mención y ofrecer un agradecimiento a los profesores Emiliano Barreto y María Teresa Reguero por permitirme formar parte de su grupo de investigación, al igual que por su orientación y atención a todas las dudas surgidas durante el camino de esta maestría y por haber compartido conmigo sus conocimientos.

Deseo expresar un agradecimiento especial a la Dra. Verónica Rincón, quien con su dirección, conocimiento y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y sobre todo por el apoyo que me brindó durante estos años de enseñanza.

A mis estimados compañeros de maestría: Camila, Diego, John y Alexandra, con quienes compartí proyectos e ilusiones, gracias por la motivación en los momentos difíciles y por haber hecho de esta etapa universitaria una vivencia que no se olvidará. A Socorrito por cada uno de sus consejos en los momentos difíciles, y por brindarme su bonita amistad.

A mis padres y hermano, el resultado de este trabajo es fruto del apoyo vital que me brindaron durante el proceso, sin su apoyo no hubiera encontrado la fuerza y energía que me conforta a crecer como persona y como profesional. También deseo dar gracias a una persona que admiro mucho: Esteban, por su paciencia y comprensión, por el tiempo que me ha concedido, contándole cada paso de este proyecto, y por sus palabras de aliento que me acompañaron en este sueño.

Finalmente agradezco a la Universidad Nacional de Colombia por ser la sede de todo el conocimiento adquirido durante estos años.

Resumen

Las infecciones asociadas a la atención en salud (IACS) causadas por microorganismos multirresistentes se asocian con un incremento en los costos para los sistemas de salud debido a la estancia prolongada de los pacientes. *Providencia rettgeri* en los últimos tiempos se ha convertido en una de las más importantes enterobacterias causante de IACS en el mundo, debido a su relación con el determinante de resistencia *bla*NDM-1 y por los altos niveles de resistencia expresados a los antimicrobianos (RAM), en especial a los carbapenémicos, agentes considerados de último recurso para el tratamiento de cepas multirresistentes. Debido a este problema de salud pública, el objetivo de este estudio fue identificar y evaluar los elementos genómicos de resistencia a antibióticos betalactámicos en cepas colombianas de *P. rettgeri*. Para ello se realizó la secuenciación de genoma completo (WGS) de 28 aislamientos obtenidos en el periodo 2015 – 2016. Así mismo, se determinó el perfil fenotípico de resistencia, se tipificaron los aislamientos y se generaron perfiles genómicos de resistencia por medio de un flujo de trabajo bioinformático, para un posterior análisis epidemiológico. Como resultado se observaron elevados porcentajes de resistencia a carbapenémicos, cefalosporinas, sulfonamidas y fluoroquinolonas; se obtuvieron por primera vez 8 rSTs de *P. rettgeri* circulando en el país, de los cuales 7 fueron nuevos. Se encontró que el rST-63073 (45%) y rST-61696 (25%) fueron dominantes. También se identificaron 116 genes mediadores de resistencia, representativos de los mecanismos de resistencia: degradación y modificación, bombas de eflujo, porinas y cambio del sitio blanco. Finalmente se realizó el pangenoma para establecer las relaciones filogenéticas y se correlacionó el perfil genómico obtenido por WGS con el perfil fenotípico de resistencia. El árbol filogenético indicó la amplia dispersión de las cepas de *P. rettgeri* en Colombia, la tipificación a partir de WGS mostró un poder discriminatorio más alto y el estudio por WGS proporcionó evidencia de un alto nivel de concordancia (96.4%) entre los perfiles fenotípicos y genotípicos de RAM para predecir resistencia a antibióticos betalactámicos y del (96,8% - 92,8%) para predecir resistencia a antibióticos No betalactámicos. Los perfiles genómicos generados en el estudio demostraron ser un determinante importante para caracterizar los aislamientos con base en el resistoma.

Palabras clave: *Providencia rettgeri*, Secuenciación de genoma completo (WGS), resistencia a los antimicrobianos (RAM), perfil fenotípico de resistencia, perfil genómico de resistencia, Infecciones asociadas a la atención en salud (IACS).

Abstract

The Healthcare-Associated Infections (HAI) caused by multiresistant microorganisms are associated with an increase in costs for health systems due to the prolonged stay of patients. *Providencia rettgeri* in recent times has become one of the most important enterobacteria causing HAI in the world, due to its relationship with the determinant of resistance *bla*NDM-1 and the high levels of resistance expressed to antimicrobials (AMR), especially carbapenems, agents considered of last resort for the treatment of multiresistant strains. Due to this public health problem, the objective of this study was to identify and evaluate the genomic elements of resistance to beta-lactam antibiotics in Colombian strains of *P. rettgeri*. For this, the whole genome sequencing (WGS) of 28 isolates obtained in the period 2015-2016 was carried out. Likewise, the phenotypic profile of resistance was determined, the isolates were typified and genomic profiles of resistance were generated through of a flow of bioinformatic work, for a later epidemiological analysis. As a result, high percentages of resistance to carbapenems, cephalosporins, sulfonamides and fluoroquinolones were observed; 8 rSTs of *P. rettgeri* circulating in the country were obtained for the first time, of which 7 were new. It was found that rST-63073 (45%) and rST-61696 (25%) were dominant. We also identified 116 resistance genes, representative of the mechanisms of resistance: degradation and modification, efflux pumps, porins and target alteration. Finally, the pangenome was performed to establish the phylogenetic relationships and the genomic profile obtained by WGS was correlated with the phenotypic profile of resistance. The phylogenetic tree indicated the wide dispersion of the *P. rettgeri* strains in Colombia, the typing from WGS showed a higher discriminatory power and the WGS study provided evidence of a high level of concordance (96.4%) between the phenotypic and genotypic profiles of RAM to predict resistance to beta-lactam antibiotics and (96.8% - 92.8%) to predict resistance to non-beta-lactam antibiotics. The genomic profiles generated in the study proved to be an important determinant to characterize the isolations based on the resistoma.

Keywords: *Providencia rettgeri*, whole genome sequencing (WGS), Antimicrobial resistance (AMR), phenotypic profile of resistance, genomic profile of resistance, Healthcare-Associated Infections (HAI).

Contenido

Pág.

Resumen ..... **VIII**

Lista de figuras **4**

Lista de tablas **6**

Lista de abreviaturas **7**

Introducción **1**

1. Objetivo general **4**
1.1 Objetivos específicos 4

2. Estado del arte **5**
2.1 Resistencia a los Antimicrobianos 5
2.2 Importancia de la vigilancia 6
2.3 Infecciones Asociadas a la Atención en Salud 7
2.4 Resistencia en la familia *Enterobacteriaceae* 8
2.5 *Providencia rettgeri* 10
2.6 Antibióticos betalactámicos 11
2.7 Resistencia bacteriana 12
2.7.1 Resistencia por mutación 13
2.7.2 Transferencia horizontal de genes..... 13
2.8 Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos 14
2.8.1 Alteración de las porinas 14
2.8.2 Bombas de E-flujo 15
2.8.3 Cambio del sitio blanco..... 16
2.8.4 Degradación del antibiótico (Betalactamasas) 16
2.9 Clasificación de las Betalactamasas 18
2.9.1 Betalactamasas de clase A 20
2.9.2 Betalactamasas de clase C 20
2.9.3 Betalactamasas de clase D 21
2.9.4 Betalactamasas de clase B 21
2.10 Nueva Delhi Metalobetalactamasa 22
2.11 Transmisión de Nueva Delhi Metalobetalactamasa 23
2.12 Técnicas para la identificación bacteriana y el diagnóstico de perfiles de susceptibilidad 25
2.13 Tipificación bacteriana 25
2.14 Secuenciación de Nueva Generación 26

2.15 Secuenciación del genoma bacteriano en microbiología clínica 27
2.16 Genómica en tiempo real para el diagnóstico en microbiología clínica 29
2.17 Secuenciación de genoma completo en aislamientos de *P. rettgeri* 31

3. Metodología 35
3.1 Aislamientos bacterianos 35
3.2 Criopreservación de los aislamientos bacterianos..... 35
3.3 Identificación microbiológica 35
3.4 Extracción de ADN genómico 36
3.5 Identificación molecular 37
3.6 Caracterización fenotípica de susceptibilidad en aislamientos de *P. rettgeri* .. 38
3.7 Detección fenotípica de carbapenemasas 39
3.8 Secuenciación del genoma completo de aislamientos de *P. rettgeri* 39
3.9 Análisis de calidad de los reads 40
3.10 Trimming de reads de baja calidad 41
3.11 Ensamblaje de novo para los genomas de *P. rettgeri* 41
3.12 Anotación genomas de *P. rettgeri* 41
3.12.1 Recopilación y agrupación de genes asociados con resistencia a diversos antibióticos 41
3.12.2 Anotación de elementos genómicos mediadores de resistencia 42
3.13 Base de datos: Almacenamiento MySQL 44
3.14 Obtención de genes de resistencia 44
3.15 Análisis genómico comparativo 45
3.16 Tipificación de aislamientos de *P. rettgeri* 45
3.17 Pan-genoma y construcción árbol filogenético. 46
3.18 Visualización comparativa circular del genoma completo. 46

4. Resultados 47
4.1 Aislamientos clínicos 47
4.2 Identificación microbiológica 50
4.3 Extracción ADN genómico 51
4.4 Identificación molecular 52
4.5 Perfil fenotípico de susceptibilidad a antibióticos betalactámicos 53
4.6 Perfil fenotípico de susceptibilidad a antibióticos No betalactámicos 56
4.7 Detección fenotípica de carbapenemasas 58
4.8 Ensamblaje y anotación de los genomas de *P. rettgeri* 59
4.9 Identificación de elementos genómicos mediadores de resistencia 60
4.10 Elementos genómicos de resistencia a antibióticos betalactámicos 65
4.11 Elementos genómicos de resistencia a antibióticos No betalactámicos 68
4.12 Tipificación de Secuencia Multilocus Ribosomal (rMLST) de genomas de *P. rettgeri* del estudio 71
4.13 Perfil genómico de resistencia a betalactámicos en *P. rettgeri* por rST y departamento 74
4.14 Perfil genómico de resistencia a No betalactámicos en *P. rettgeri* por rST y departamento 77
4.15 Análisis genómico comparativo entre genomas de *P. rettgeri* del estudio 79
4.15.1 Pan-genoma y Análisis filogenético 79
4.16 Análisis genómico comparativo con genomas de referencia de *P. rettgeri* 84
4.16.1 Tipificación de Secuencia Multilocus Ribosomal (rMLST) de genomas de referencia de *P. rettgeri* 84
4.16.2 Análisis filogenético de genomas de *P. rettgeri* del mundo 85

4.16.3 Visualización comparativa a nivel genómico de rSTs mayoritarios (rST-63073 y rST-61696) 88
4.17 Correlación del perfil fenotípico y el perfil genómico de resistencia a antibióticos betalactámicos 91
4.18 Correlación del perfil fenotípico y el perfil genómico de resistencia a antibióticos No betalactámicos....94
4.19 Genomas secuenciados de *P. rettgeri* en la actualidad 98

5. Discusión 99

6. Conclusiones....119

7. Recomendaciones 120

A. Anexo: Procedimientos 121

B. Anexo: Scripts....124

C. Anexo: Tablas....125

Bibliografía 127

Lista de figuras

Pág.

Figura 2-1: Listado de bacterias resistentes a los antibióticos de prioridad global para la investigación y el desarrollo de tratamientos antibióticos nuevos. 9
Figura 2-2 Distribución geográfica de Enterobacterias productoras de metalobetalactamasa NDM. 24
Figura 2-3 Gráfico costos de secuenciación por genoma. 28
Figura 2-4 Flujo de trabajo hipotético en microbiología basado en secuenciación de genoma completo. 30
Figura 3-1 Flujo de trabajo Bioinformático para el ensamblaje y la anotación de los genomas de *P. rettgeri*. 40
Figura 3-2 Tipificación de Secuencia Multilocus Ribosomal (rMLST). 45
Figura 4-1 Porcentaje de aislamientos de *P. rettgeri* enviados por departamento. 47
Figura 4-2 **Porcentaje de aislamientos de *P. rettgeri* enviados por año de recolección y** departamento. 48
Figura 4-3 Aislamientos de *P. rettgeri* por tipo de fuente y año de recolección. 49
Figura 4-4 Grupos de edad de los pacientes en los que se aisló *P. rettgeri.* 49
Figura 4-5 Crecimiento de colonias de *P. rettgeri* en agar MacConkey. 50
Figura 4-6 Crecimiento de colonias de *P. rettgeri* en agar LEEDS. 50
Figura 4-7 Electroforesis ADN genómico de aislados de *P. rettgeri.* 51
Figura 4-8 PCR gen 16S rRNA en aislamientos de *P. rettgeri.* 52
Figura 4-9 Perfil fenotípico de resistencia a antibióticos betalactámicos. 53
Figura 4-10 Perfil fenotípico de resistencia a antibióticos No betalactámicos. 56
Figura 4-11 Detección fenotípica de carbapenemasas. 58
Figura 4-12 Elementos Genómicos asociados con resistencia a antibióticos betalactámicos en *P. rettgeri.* 66
Figura 4-13 Elementos Genómicos asociados con resistencia a antibióticos No betalactámicos en *P. rettgeri.* 68
Figura 4-14 Distribución de aislamientos de *P. rettgeri* por rST y departamento. 72
Figura 4-15 Distribución de *P. rettgeri* por rST y período de recolección. 73
Figura 4-16 Distribución de *P. rettgeri* por rST en la capital. 74
Figura 4-17 Perfil genómico de resistencia a betalactámicos por rST y departamento. 75

Figura 4-18 Perfil genómico de resistencia a No betalactámicos por rST y departamento. 77
Figura 4-19 Árbol filogenético genomas colombianos de *P. rettgeri.* 81
Figura 4-20 Árbol filogenético genomas de *P. rettgeri* del mundo. 87
Figura 4-21 Visualización comparativa circular de los genomas completos de *P. rettgeri* rST-61696. 89
Figura 4-22 Visualización comparativa circular de los genomas completos de *P. rettgeri* rST-63073. 90
Figura 4-23 Comparación del perfil genómico obtenido a partir de WGS y el perfil fenotípico de resistencia a antibióticos betalactámicos en aislados de *P. rettgeri.* 92
Figura 4-24 Comparación del perfil genómico obtenido a partir de WGS y el perfil fenotípico de resistencia a antibióticos No betalactámicos en aislados de *P. rettgeri.* 97
Figura 4-25 Genomas secuenciados de *P. rettgeri* en la actualidad. 98

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1: Esquema de clasificación de betalactamasas. 19
Tabla 2-2 Genomas secuenciados de *P. rettgeri* reportados al NCBI. 31
Tabla 3-1 Concentraciones PCR y mezcla final para amplificación del gen 16S rRNA 37
Tabla 3-2 Herramientas de predicción de funciones utilizadas por Prokka. 43
Tabla 4-1 Perfil de susceptibilidad de aislamientos de *P. rettgeri* a antibióticos betalactámicos. 55
Tabla 4-2 Perfil de susceptibilidad de aislamientos de *P. rettgeri* a antibióticos No betalactámicos. 57
Tabla 4-3 Resultados promedios del ensamblaje de genomas de *P. rettgeri* con SPAdes. 59
Tabla 4-4 Genes de resistencia asociados a Degradación y Modificación del antibiótico en aislamientos de *P. rettgeri.* 61
Tabla 4-5 Genes de resistencia asociados a Bombas de Eflujo en aislamientos de *P. rettgeri.* 62
Tabla 4-6 Genes de resistencia asociados a Cambio del sitio blanco en aislamientos de *P. rettgeri.* 64
Tabla 4-7 Genes de resistencia asociados a porinas en aislamientos de *P. rettgeri.* 65

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ABC	Familia de casete de unión a ATP
BLEE	Betalactamasas de Espectro Extendido
BRIG	BLAST Ring Image Generator
CDC	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades
EBI	Instituto Europeo de Bioinformática
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGMs	Elementos genéticos móviles
IACS	Infecciones Asociadas a la Atención en Salud
INS	Instituto Nacional de Salud
MATE	Familia de extrusión de compuestos tóxicos y múltiples fármacos
MDR	Multidrug-resistant
MFS	Superfamilia del facilitador mayor
MLST	Tipificación de Secuencias Multilocus
NCBI	Centro Nacional de Información de Biotecnología
NDM	Nueva Delhi Metalobetalactamasa
NGS	Next Generation Sequencing (Secuenciación de Nueva Generación)
NGS QC	Next Generation Sequencing, Quality Control
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PFGE	Electroforesis en Gel de Campo Pulsado
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RAM	Resistencia a los Antimicrobianos
rMLST	Tipificación de Secuencia Multilocus Ribosomal
RPM	Revoluciones por minuto
RND	Familia de resistencia a división por nodulación
SDD	Dosis dependiente
SMR	Familia de resistencia pequeña a multifármacos
TAE	Tris-Acetato-EDTA
THG	Transferencia horizontal de genes
WGS	Whole Genome Sequencing (Secuenciación de Genoma Completo)

Introducción

Las infecciones asociadas a la atención en salud (IACS) son el evento adverso más frecuente en la prestación de asistencia médica en todo el mundo. Cientos de millones de pacientes se ven afectados por IACS cada año, lo que lleva a una mortalidad significativa y pérdidas financieras para los sistemas de salud (Haque, Sartelli, McKimm, & Abu Bakar, 2018). Las IACS causadas por enterobacterias son foco de atención en todo el mundo debido a la resistencia que ejercen a los antibióticos disminuyendo las opciones terapéuticas para su tratamiento (Safdar et al., 2014). La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en el año 2017 una lista de patógenos prioritarios para el desarrollo de nuevos antibióticos, siendo las enterobacterias productoras de carbapenemasas de prioridad crítica para la investigación en todo el mundo (WHO, 2017).

La producción de carbapenemasas representa en la actualidad uno de los principales problemas en el ámbito hospitalario (Queenan & Bush, 2007) (Nordmann, 2010) (Martínez-Martínez & González-López, 2014). La expresión de estas enzimas asociadas a la presión selectiva ejercida durante el uso excesivo de antimicrobianos y a la transferencia horizontal de genes mediada por plásmidos y plataformas móviles (Sultan et al., 2018), permiten a las bacterias hidrolizar de manera eficaz diversos antibióticos entre ellos a los carbapenémicos; antimicrobianos de última elección en el tratamiento de infecciones por microrganismos multirresistentes (Nordmann, Naas, & Poirel, 2011) (Nordmann P, Dortet L, & Poirel L, 2012). Aunque la producción de estas enzimas inicialmente fue considerada poco frecuente, los estudios realizados en las últimas décadas han generado preocupación entre los clínicos y en los grupos de investigación por el reto terapéutico que representan y por su impacto negativo en el desenlace clínico de los pacientes (Poirel, Pitout, & Nordmann, 2007).

Providencia rettgeri es una de las enterobacterias más relevante en la actualidad, debido a que está causando brotes en todo el mundo que son especialmente difíciles de controlar (Pasteran et al., 2014) (Carmo Junior et al., 2015) (Tshisevhe, Lekalakala,

Tshuma, Janse van Rensburg, & Mbelle, 2016), (R. Alejandro Marquez-Ortiz et al., 2017) (Sharma, Sharma, & Soni, 2017) (Shin et al., 2018). Su circulación se ha visto asociada con la capacidad para expresar una de las resistencias más desfavorables a nivel clínico, la producción de metalobetalactamasas (MBLs) principalmente de tipo NDM (Mataseje et al., 2014) (Olaitan, Diene, Assous, & Rolain, 2015) (Saavedra-Rojas, Duarte-Valderrama, González-de-Arias, & Ovalle-Guerro, 2017) (Otlu et al., 2018) (Wang & Brucker, 2019). La presencia de esta carbapenemasa ha establecido una importante alarma mediática debido al perfil multirresistente de los aislados que la producen, siendo resistentes a casi todos los agentes antimicrobianos existentes especialmente a los betalactámicos (Rasheed et al., 2013) (Zmarlicka, Nailor, & Nicolau, 2015).

En Colombia, existen pocos reportes de *P. rettgeri* albergando el mecanismo NDM-1 (Saavedra-Rojas et al., 2017), no obstante el Instituto Nacional de Salud (INS) reportó a *P. rettgeri* como la segunda enterobacteria portadora de NDM-1 en el país (datos no publicados), y un informe del año 2017 informa que *P. rettgeri* desempeña un papel central para la difusión de *bla*NDM-1 en América Latina (Ricaurte Alejandro Marquez-Ortiz et al., 2017). Sin embargo, no se han documentado estudios en Colombia donde se identifiquen otros mecanismos de resistencia en *P. rettgeri* que estén contribuyendo a su potencial de resistencia, como la presencia betalactamasas de espectro extendido (BLEE), metaloenzimas y carbapenemasas los cuales se han informado cada vez con mayor frecuencia en diferentes partes del mundo (Bahar, Eraç, Mert, & Gülay, 2004) (Shiroto et al., 2005) (Shin et al., 2018).

La caracterización fenotípica de los perfiles de resistencia es una de las limitantes en la identificación de los mecanismos de resistencia. Esta caracterización es llevada a cabo en los laboratorios de microbiología a través de paneles automatizados o de pruebas fenotípicas, desafortunadamente, los sistemas fenotípicos a menudo no pueden detectar las características variables presentes entre especies, lo que resulta ser una limitación (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2011). Al no disponer de una identificación adecuada del perfil de susceptibilidad, la administración de la terapia antimicrobiana es empírica y podría limitarse, propiciando la presión selectiva y dejando en circulación bacterias cada vez más potentes. En comparación con los métodos convencionales de identificación fenotípica, las metodologías basadas en la secuenciación

de los genomas bacterianos, están presentando una mayor fiabilidad y reproducibilidad y han revolucionado la identificación en los últimos tiempos (Tagini & Greub, 2017).

Actualmente, el desarrollo y el uso de técnicas moleculares como la Secuenciación de Nueva Generación (NGS) ha impulsado el estudio y el análisis de los genomas completos en diversos grupos de organismos de una forma más asequible y con mayor precisión comparada con otras técnicas que se han venido utilizando en el campo clínico e investigativo (Quainoo et al., 2017). Es por esto que técnicas como la secuenciación del genoma completo (WGS) están transformando la práctica en la microbiología clínica, y gracias a la disminución en costo y tiempo, cada vez más se están convirtiendo en una tecnología viable, tanto, para la investigación microbiana como en la práctica en el diagnóstico microbiológico (Koser et al., 2012) (Rossen, Friedrich, & Moran-Gilad, 2018).

En la última década, el número de genomas bacterianos secuenciados ha aumentado exponencialmente, permitiendo avances importantes encaminados a la tipificación, identificación de brotes y en la formulación de estrategias para el control de las IACS (Reuter et al., 2013). Sin embargo, hasta el momento, se tienen pocos reportes de genomas secuenciados de *Providencia rettgeri,* y tan solo unos pocos se han obtenido a partir de aislados clínicos (Galac & Lazzaro, 2012) (Pereira, Albano, Asensi, & Carvalho-Assef, 2015) (Olaitan et al., 2015). En Latinoamérica solo dos genomas de *P. rettgeri* se han secuenciado, uno aislado de una herida quirúrgica en Brasil (Pereira et al., 2015) y uno aislado de una fuerte de orina en Colombia (Marquez-Ortiz et al., 2017). Ante la escasa información reportada a nivel mundial y considerando el especial interés que *P. rettgeri* ha tomado en los últimos tiempos, es importante implementar en nuestro país el uso de tecnologías, como la secuenciación de genoma completo, que permitan revolucionar y aportar información frente a determinantes de importancia clínica. Es por ello, que el presente estudio implementará el uso de WGS, secuenciando 28 genomas colombianos de *P. rettgeri* obtenidos del período 2015-2016, con el fin de obtener información específica de las características genómicas y de los genes asociados a resistencia antibiótica para dar un acercamiento a la epidemiología y relaciones filogenéticas de los aislamientos circulantes en el país.

1. Objetivo general

Comparar los elementos genómicos de resistencia a antibióticos betalactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri* aisladas durante el periodo 2015-2016.

1.1 Objetivos específicos

1. Caracterizar fenotípicamente la resistencia a antibióticos betalactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri.*

2. Identificar los elementos genómicos de resistencia a antibióticos betalactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri.*

3. Correlacionar el perfil genotípico y el perfil fenotípico de resistencia a antibióticos betalactámicos en cepas colombianas de *Providencia rettgeri.*

2. Estado del arte

2.1 Resistencia a los Antimicrobianos

El desarrollo de la Resistencia a los Antimicrobianos (RAM) es un proceso que se ha observado desde el descubrimiento de los primeros antibióticos, de hecho, se han descrito genes que han conferido resistencia a los medicamentos en algunas bacterias incluso antes del uso clínico de los antibióticos o más aún de muestras procedentes de hace más de 30.000 años (Adedeji, 2016). En los últimos tiempos, la RAM se ha convertido cada vez más en un problema de salud pública mundial debido a que el uso excesivo de los antimicrobianos, ha aumentado la velocidad en la que se desarrolla y se propaga la resistencia. A su vez, su complejidad es mayor debido a que en la actualidad se carece de nuevos fármacos para combatir a microorganismos con características de multirresistencia (Ventola, 2015).

A nivel mundial, la falta de campañas de sensibilización pública para educar a la población frente al problema de la resistencia, la escasez de suministro de nuevos antibióticos, el uso de antimicrobianos sin moderación tanto en humanos como en animales, así como, el uso extensivo e innecesario de antibióticos en la agricultura hacen que la resistencia a los antimicrobianos sea una de las mayores amenazas a la salud que enfrenta la humanidad ahora y en las próximas décadas (Michael, Dominey-Howes, & Labbate, 2014).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) emitió por primera vez en el año 2014, un reporte sobre la vigilancia y la información sobre la RAM, haciendo un enfoque particular en la resistencia bacteriana a nivel mundial; se informó que la grave amenaza dejo de ser una previsión para el futuro y es ya en todas las regiones del mundo una realidad que puede afectar a personas de cualquier edad y en cualquier país. El informe advirtió que en ausencia de medidas urgentes y coordinadas, el mundo está abocado a una era post-antibiótica, en la que infecciones comunes y lesiones menores que han sido tratables durante decenios volverán a ser potencialmente mortales (OMS, 2014).

El impacto económico y los costos humanos generados por la RAM son alarmantes. Actualmente, se estima que ocurren 700.000 muertes anuales debida a la resistencia a los antimicrobianos en el mundo (Jim O'Neill, 2016). Para el año 2050 se estima que esta cifra ascenderá a los 10 millones de muertes al año atribuibles a la RAM, generando pérdidas del orden de los 100 billones de dólares americanos (USD), esto si no se encuentran soluciones proactivas para frenar el aumento de la resistencia a los antimicrobianos.

2.2 Importancia de la vigilancia

La OMS ha emitido varias alertas y ha documentado estrategias necesarias para combatir el problema de la RAM. En Marzo de 2015, la OMS estableció un proyecto de acción mundial sobre la resistencia, uno de los objetivos estratégicos contemplo el reforzar los conocimientos y la base científica a través de la vigilancia y la investigación. Entre las carencias especialmente importantes de conocimientos en las que es necesario subsanar se incluyeron temas como: la incidencia, la prevalencia, los diferentes tipos de patógenos y las pautas geográficas relacionadas con la resistencia a los antimicrobianos y determinó que es necesario facilitar de manera oportuna esta información, a fin de guiar el tratamiento de los pacientes, sentar la base de las medidas de control y supervisar la eficacia de las intervenciones realizadas en cada región (OMS, 2015).

Para el año 2016, la comunidad médica mundial adoptó un plan de diez puntos para combatir la RAM, expuesta en el proyecto: "*Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations* (Jim O'Neill, 2016)". El plan manifiesta que la vigilancia es una de las piedras angulares de las enfermedades infecciosas, sin embargo sigue teniendo recursos insuficientes en la lucha contra RAM. Sin una buena vigilancia, no se puede contrarrestar de manera efectiva la amenaza que representa la resistencia a los antimicrobianos para los sistemas de salud en todo el mundo. El estudio informa que la vigilancia de la RAM idealmente debería incluir una línea enfocada en los datos de biología molecular para explicar las bases biológicas de la resistencia, a través de la caracterización de los tipos de bacterias resistentes y las razones genéticas de su resistencia (Jim O'Neill, 2016).

Adicionalmente, en este informe se propone que la RAM debe desarrollar una red de vigilancia global y manifiestan la importancia de encontrar formas de incentivar y eliminar las barreras para el intercambio de datos apropiados a los esfuerzos de vigilancia mundial.

Un desafío que ha tomado especial interés, es garantizar que los sistemas de salud, los médicos y los investigadores puedan aprovechar al máximo la "*Big data*" que se está generando a medida que se modernizan las herramientas de diagnóstico (como en la actualidad la revolución de la genómica comparativa con herramientas como la secuenciación de genoma completo), informan que para el aprovechamiento de la nueva información generada por las nuevas metodologías, se deben adoptar estrategias como la computación en la nube (*Cloud Computing*), esto representaría una rica fuente potencial de información para la vigilancia mundial, dado que generaría datos más representativos para los sistemas de salud y contribuiría a formar un red mundial para neutralizar la RAM (Jim O'Neill, 2016).

2.3 Infecciones Asociadas a la Atención en Salud

La ocurrencia y las complicaciones indeseables de las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IACS) han sido bien reconocidas durante las últimas décadas. Las IACS según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) se definieron como aquellas que se desarrollan durante la hospitalización, pero no están presentes ni se incuban tras el ingreso del paciente al hospital; generalmente para aquellas infecciones que ocurren más de 48 a 72 horas después del ingreso y dentro de los 10 días posteriores al alta hospitalaria (Collins, 2008). Estas infecciones no anticipadas se desarrollan durante el curso del tratamiento de atención médica y dan como resultado enfermedades y muertes significativas del paciente; además prolongan la estancia hospitalaria; y requieren intervenciones diagnósticas y terapéuticas adicionales, que generan costos adicionales a los ya incurridos por la enfermedad subyacente del paciente (Collins, 2008)

Es importante para los sistemas de salud detectar, prevenir y reducir las IACS, debido a que son causa importante de muerte e incremento de la morbilidad en pacientes hospitalizados; además se consideran el evento adverso más frecuente en la atención sanitaria (Morgan, Lomotan, Agnes, McGrail, & Roghmann, 2010). Su verdadera carga económica mundial se desconoce debido a la dificultad para reunir datos fiables. La OMS estima que entre el 5% y el 10% de los pacientes atendidos en instituciones de salud de países desarrollados contraerán una o más IACS (Ministerio de Salud, 2014). En 2013, la proporción de infecciones intrahospitalarias en Colombia fue de 1,25 a nivel nacional,

siendo Antioquia (2,02), Bogotá (1,37), Santander (1,58), Tolima (1,4) y Valle del Cauca (1,77) los departamentos con las tasas más altas (Ministerio de Salud, 2014).

Estas IACS son causadas frecuentemente por microorganismos que albergan un arsenal de mecanismos de resistencia, los cuales no permiten dar un tratamiento efectivo para incurrir en la mejora del paciente colonizado (Morgan et al., 2010). Más del 70 por ciento de las bacterias que causan IACS son resistentes al menos a uno de los medicamentos comúnmente utilizados para tratar su infección (Collins, 2008), además la elevada frecuencia de estos microorganismos en ámbitos hospitalarios aumentan el riesgo de colonización. La Secretaría de Salud de Bogotá, reportó en 2014 que los servicios con mayor porcentaje de IACS por microorganismos resistentes fueron UCI 48,6%, cirugía general 35% y pediatría 22,4% (Ministerio de Salud, 2014).

Observando esta información, se puede entender que las IACS son un factor importante en aproximadamente 1 de cada 3 muertes inesperadas en un hospital, además que las bacterias resistentes a múltiples fármacos son la causa más común de su aparición (Morgan et al., 2010). Para reducir la mortalidad debida a las IACS, los esfuerzos de prevención de infecciones deben centrarse en medidas que permitan entender los mecanismos de acción de los microrganismos frente a los antimicrobianos, así como la unión de esfuerzos por parte de los trabajadores de la salud, para evitar la colonización de los pacientes inmunosuprimidos, estas serán medidas necesarias para combatir la prevalencia de las IACS en las instituciones de salud del mundo (Collins, 2008) (Morgan et al., 2010).

2.4 Resistencia en la familia *Enterobacteriaceae*

En el año 2017, la OMS publicó la primera lista de patógenos prioritarios como una herramienta para para guiar y promover la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos. El listado se estableció teniendo en cuenta criterios de priorización como: mortalidad generada por la RAM, carga a la asistencia sanitaria, prevalencia y tendencia de la resistencia por más de diez años. Se determinó un grupo de patógenos según la especie y el tipo de resistencia y se estratificaron los resultados en tres niveles prioritarios: crítico, alto y medio. Esta lista notificó que las enterobacterias resistentes a carbapenémicos y a cefalosporinas de tercera generación son consideradas de prioridad crítica para la investigación en todo el mundo (Figura 2-1) (WHO, 2017).

Las enterobacterias que tienen la capacidad de producir betalactamasas como betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas, son foco de atención a nivel mundial debido a que generan resistencia a la mayoría de antibióticos betalactámicos; antimicrobianos que son utilizados como herramienta terapéutica de última elección para microorganismos con perfiles de multirresistencia (Nordmann, Naas, et al., 2011). En la actualidad la tasa de mortalidad en infecciones por enterobacterias resistentes a carbapenémicos es alta, en una publicación presentada en el año 2014 se calculó que el 26 al 44 % de las muertes en diferentes estudios eran atribuibles a este tipo de microorganismos en todo el mundo (Falagas, Tansarli, Karageorgopoulos, & Vardakas, 2014). En Colombia el número de aislamientos de enterobacterias enviadas a confirmación de carbapenemasas es eminente, entre los años 2012 a 2016, 1440 aislamientos fueron enviados para estos fines, demostrando que las tasas de resistencia atribuibles a carbapenémicos entre diferentes especies de enterobacterias es un hecho preocupante también en el país (Ovalle, Rojas, Valderrama, & Durán, 2016).

Figura 2-1: Listado de bacterias resistentes a los antibióticos de prioridad global para la investigación y el desarrollo de tratamientos antibióticos nuevos.

Tomado de (WHO, 2017)

2.5 *Providencia rettgeri*

P. rettgeri es un bacilo gram negativo, móvil, no fermentador de lactosa y anaerobio facultativo (Manos & Belas, 2006). Las especies del género *Providencia* se han relacionado taxonómicamente con los géneros *Proteus* y *Morganella,* siendo agrupados dentro de la tribu proteae, estos géneros bacterianos tienen la capacidad de desaminar oxidativamente la fenilalanina, lo que los hace diferentes de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (O'Hara, Brenner, & Miller, 2000). *P. rettgeri* es móvil por flagelos peritricos; sin embargo, no presentan el desplazamiento bacteriano "swarming" exhibido en *Proteus,* especie relacionada taxonómicamente (Manos & Belas, 2006). La baja producción de urea es característico de la mayoría de especies de *Providencia*, no obstante las cepas de *P. rettgeri*, son productoras de ureasa (Jones & Mobley, 1987).

Providencia rettgeri es un patógeno oportunista asociado principalmente a infecciones del tracto urinario especialmente en pacientes hospitalizados, inmunosuprimidos y de edad avanzada, con catéteres urinarios permanentes (O'Hara et al., 2000) (Wie, 2015) (Sagar, 2017). Ha sido aislado como agente etiológico del síndrome de bolsa de orina púrpura (Al-Jubouri & Vardhan, 2001) y se ha relacionado con infecciones oculares, de heridas, bacteremia y diarrea del viajero (Koreishi, Schechter, & Karp, 2006) (Washington, Barnhill, & Griffin, 2015) (Choi, Kim, Kim, Park, & Uh, 2015) (Yoh et al., 2005). En una incidencia baja se ha presentado como agente infeccioso de meningitis y pielonefritis e incluso a colonizado desfibriladores implantables (Maiti, Pandey, & Singh, 2013) (Lee & Hong, 2011) (Marull & De Benedetti, 2009).

Las enterobacterias constituyen uno de los principales grupos portadores de multirresistencia en las instituciones de salud; siendo *P. rettgeri* uno de los microorganismos, representantes del género, que ha tomado especial importancia en los últimos años (Olaitan et al., 2015) *P. rettgeri* ha tomado relevancia para los investigadores de todo el mundo, debido a que, en la última década se ha visto relacionado con la adquisición de estructuras genéticas móviles (Marquez-Ortiz et al., 2017), que le han conferido la capacidad de hidrolizar diferentes antimicrobianos, entre ellos, a los antibióticos betalactámicos, mitigando su actividad y logrando que la acción de estos sea deficiente; constituyendo una gran amenaza, ya que, estos antibióticos, especialmente los carbapenémicos, son utilizados como la herramienta terapéutica para microorganismos con altos niveles de resistencia (Nordmann P et al., 2012).

P. rettgeri se ha visto fuertemente asociado con la producción de enzimas conocidas como metalobetalactamasas, especialmente con la producción de la familia NDM (Nueva Delhi Metalobetalactamasa, por sus siglas en inglés) (Barrios et al., 2013) (Gefen-Halevi et al., 2013) (Carvalho-Assef et al., 2013) (Tada et al., 2014) (Pasteran et al., 2014) (Olaitan et al., 2015) (Carmo Junior et al., 2015) (Marquez-Ortiz et al., 2017); la adquisición de esta resistencia es una de las más desfavorables a nivel clínico, debido a que, desde su aparición en el año 2008 (Yong et al., 2009) se ha visto fuertemente relacionada con la hidrólisis de antibióticos betalactámicos (exceptuando al aztreonam) (Walsh, Toleman, Poirel, & Nordmann, 2005). Los reportes a nivel mundial asociados a resistencia en cepas de *P. rettgeri* portando la metalobetalactamasa NDM han ido aumentando considerablemente, de manera que demuestran la gran versatilidad de este microorganismo y lo potencializan aún más como un importante patógeno causante de IACS (Olaitan et al., 2015).

En Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS), detectó entre el año 2012 y 2013 la circulación de los primeros catorce aislamientos de *P. rettgeri* portando NDM-1 y circulando en dos diferentes departamentos del país: Cundinamarca y Santander (Saavedra-Rojas et al., 2017), y en un informe realizado por la Secretaria Distrital de Salud, para el año 2015 *P. rettgeri* era el principal microorganismo portador de NDM-1 en Colombia (Secretaría Distrital de Salud & Sub-dirección Vigilancia en Salud Pública, 2015). En la actualidad informes del INS (datos no publicados), ubican a *P. rettgeri* como la segunda enterobacteria portadora NDM-1 en el país después de *K. pneumoniae*, los resultados de resistencia exhiben como el gen NDM-1 están confiriéndole a *P. rettgeri* perfiles de multirresistencia, limitando las opciones de tratamiento.

2.6 Antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos son los antimicrobianos más importantes y de uso frecuente que inhiben la síntesis de la pared celular, lo que resulta en la lisis bacteriana y, por lo tanto, son bactericidas (Kong, Schneper, & Mathee, 2010). Este grupo de antibióticos se caracteriza por poseer una estructura molecular común que consta de un anillo heterocíclico que contiene tres átomos de carbono y un átomo de nitrógeno denominado anillo betalactámico, en los que su actividad antimicrobiana depende de la integridad de dicho anillo (Etebu & Arikekpar, 2016). Este anillo betalactámico puede unirse con otros anillos y cadenas laterales dando lugar a cuatro grandes grupos principales: Penicilinas,

Cefalosporinas, Monobactámicos y Carbapenémicos (Etebu & Arikekpar, 2016). En esta familia de antibióticos suelen incluirse los inhibidores de las betalactamasas; los cuales también incluyen un anillo betalactámico y tienen una reconocida actividad farmacológica al combinarse con los antibióticos, potenciando su acción (Drawz & Bonomo, 2010) (Bush & Bradford, 2016).

El mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos consiste en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, interfiriendo en la síntesis del peptidoglicano mediante un bloqueo en la última etapa de su producción, la transpeptidación, además de esto los antibióticos betalactámicos también actúan activando una autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano, llevando finalmente a la muerte celular (Kong et al., 2010).

Los antibióticos del grupo betalactámico son usados globalmente como agentes contra infecciones causadas por bacterias multirresistentes, y aproximadamente el 50% de todos los antimicrobianos formulados pertenecen a este grupo; sin embargo, desafortunadamente, la resistencia a esta importante clase segura y eficiente de antibióticos está aumentando en todo el mundo (King, Sobhanifar, & Strynadka, 2017). La aparición y el aumento de la resistencia están ejerciendo mucha presión a las entidades de salud y representa un desafío para los expertos en clínica. La resistencia a los compuestos betalactámicos se debe principalmente a la producción de betalactamasas que hidrolizan y, por lo tanto, desactivan los antibióticos betalactámicos (Poole, 2004). A la fecha se han reconocido más de 500 tipos de betalactamasas en diferentes especies bacterianas, dada su complejidad y diversidad el estudio de nuevos tipos es continuo a nivel mundial (https://www.lahey.org/studies/). Se sabe que el uso irracional y persistente de antibióticos es uno de los desencadenantes más importantes para provocar y diseminar la resistencia a los antibióticos (Scarafile, 2016).

2.7 Resistencia bacteriana

Las bacterias tienen una notable plasticidad genética que les permite responder a una amplia gama de amenazas ambientales, incluida la presencia de moléculas de antibióticos que pueden poner en peligro su existencia. Desde una perspectiva evolutiva, las bacterias utilizan dos estrategias genéticas principales para adaptarse a la agresión de los antibióticos: 1) mutaciones génicas asociadas con el mecanismo de acción del

antibiótico; y 2) adquisición de ADN extraño que codifica determinantes de resistencia mediante la transferencia horizontal de genes (Blázquez, Oliver, & Gómez-Gómez, 2002).

2.7.1 Resistencia por mutación

Un subconjunto de bacterias derivadas de una población susceptible desarrolla mutaciones en los genes que afectan la actividad del fármaco, lo que resulta en la supervivencia en presencia de la molécula antimicrobiana. Una vez, que emerge un mutante resistente, el antibiótico elimina la población susceptible y predominan las bacterias resistentes (Coculescu, 2009). En general, las mutaciones que resultan en resistencia antimicrobiana alteran la acción del antibiótico a través de uno de los siguientes mecanismos: 1) modificaciones en el sitio blanco del antimicrobiano; 2) disminución en la captación del fármaco; 3) activación de mecanismos de flujo de salida para eliminar la molécula dañina; o 4) cambios globales en rutas metabólicas importantes mediante la modulación de redes reguladoras (Cag, Caskurlu, Fan, Cao, & Vahaboglu, 2016). Por lo tanto, la resistencia que surge debido a los cambios por mutaciones adquiridas es diversa y varía en complejidad.

2.7.2 Transferencia horizontal de genes

La adquisición de material de ADN extraño a través de la transferencia horizontal de genes (THG) es uno de los pilares más importantes de la evolución bacteriana y con frecuencia es responsable del desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos (Andam, Fournier, & Gogarten, 2011). La mayoría de los agentes antimicrobianos utilizados en la práctica clínica se derivan de productos que se encuentran naturalmente en el ambiente. Las bacterias que comparten el medio ambiente con estas moléculas albergan determinantes genéticos intrínsecos de resistencia y se ha informado que ese resistoma ambiental es una fuente para la adquisición de genes de resistencia a antibióticos en bacterias clínicamente relevantes (Coculescu, 2009). Además, este intercambio genético se ha implicado en la diseminación de la resistencia a muchos antibióticos de uso frecuente (Lerminiaux & Cameron, 2018).

Las bacterias adquieren material genético externo a través de tres estrategias principales:1) transformación (incorporación de ADN desnudo); 2) transducción (mediada por fagos) y 3) conjugación (transferencia entre una bacteria donadora y una receptora

mediante contacto directo) (Lerminiaux & Cameron, 2018). La aparición de resistencia en el entorno hospitalario a menudo implica la conjugación, un método muy eficaz de transferencia de genes que implica el contacto de célula a célula. Como regla general, la conjugación utiliza elementos genéticos móviles (EGMs) como vehículos para compartir información genética de importancia. Los EGMs más importantes son los plásmidos y los transposones, los cuales juegan un papel crucial en el desarrollo y la diseminación de la resistencia antimicrobiana entre los organismos clínicamente relevantes (Frost, Leplae, Summers, & Toussaint, 2005) (Sultan et al., 2018).

2.8 Mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos

Las bacterias con el pasar del tiempo han evolucionado el número de mecanismos de resistencia. Particularmente, para los betalactámicos, se han conocido cuatro formas principales que son utilizadas por las bacterias huésped para evitar los efectos bactericidas de estos antibióticos:

I. Alteración de las porinas (Disminución en la absorción del antibiótico).
II. Bombas de Eflujo (Sistema que expulsa antibióticos fuera de la célula, lo que disminuye las concentraciones intracelulares del antibiótico).
III. Cambio del sitio blanco (Interferencia con el sitio objetivo, disminuyendo la afinidad por el antibiótico)
IV. Degradación del antibiótico (Producción de enzimas betalactamasas que rompe el anillo betalactámico y hace que el antibiótico sea inactivo antes de que alcance el objetivo).

2.8.1 Alteración de las porinas

Los antibióticos betalactámicos deben penetrar la membrana externa para ejercer su efecto antimicrobiano (Cag et al., 2016). Las bacterias han desarrollado mecanismos para evitar que el antibiótico alcance su objetivo intracelular o periplásmico al disminuir la absorción de la molécula antimicrobiana. De hecho, la membrana externa actúa como la primera línea de defensa contra la penetración de múltiples compuestos tóxicos, incluidos varios agentes antimicrobianos como los betalactámicos (Delcour, 2009). Las moléculas

hidrófilas como los antibióticos betalactámicos se ven particularmente afectadas por los cambios en la permeabilidad de la membrana externa, ya que, a menudo usan canales de difusión llenos de agua conocidos como porinas para cruzar esta barrera (Delcour, 2009) (Cag et al., 2016)

Se han descrito varios tipos de porinas, y se pueden clasificar según su estructura (trimérica a monomérica), su selectividad y la regulación de su expresión (Pagès, James, & Winterhalter, 2008). Las alteraciones de las porinas podrían lograrse mediante 3 procesos generales: 1) un cambio en el tipo de porina expresada; 2) un cambio en el nivel de expresión de la porina y 3) deterioro de la función de la porina (Nikaido, 2003). Es importante destacar que los cambios en la permeabilidad a través de cualquiera de estos mecanismos resultan con frecuencia en una resistencia de bajo nivel y a menudo se asocian con otros mecanismos de resistencia, como el aumento de la expresión de las bombas de salida (Nikaido, 2003).

2.8.2 Bombas de E-flujo

La sobreexpresión de las bombas de flujo de salida, es un sistema que expulsa los antibióticos fuera de la célula, disminuyendo las concentraciones intracelulares del antibiótico (Poole, 2005). Esencialmente, este sistema de salida activo está compuesto por un complejo de proteínas especializadas que forman un puente entre la membrana citoplasmática y la membrana externa (Nikaido & Pagès, 2012). Una proteína transportadora en la membrana citoplasmática, capaz de capturar moléculas ubicadas en el citoplasma, está vinculada a una proteína accesoria, conectada a su vez con un canal de proteína a la membrana externa por donde elimina el compuesto (Nikaido & Pagès, 2012). Este mecanismo de resistencia afecta a una amplia gama de antimicrobianos incluyendo a los betalactámicos (Poole, 2005). Los genes que codifican las bombas de flujo de salida pueden ubicarse en los EGMs o en el cromosoma (Pagès et al., 2010). Es importante destacar que las bombas codificadas cromosómicamente pueden explicar la resistencia inherente de algunas especies bacterianas a un antibiótico particular (Poole, 2005).

Existen 5 familias principales de bombas de flujo de salida: 1) MFS (superfamilia del facilitador mayor), 2) SMR (familia de resistencia pequeña a multifármacos), 3) RND (familia de resistencia a división por nodulación), 4) ABC (familia de casete de unión a ATP)

y 5) MATE (familia de extrusión de compuestos tóxicos y múltiples fármacos) (Piddock, 2006). Estas familias difieren en términos de conformación estructural, fuente de energía, rango de sustratos que pueden expulsar y en el tipo de organismos bacterianos en los que están distribuidos (X.-Z. Li & Nikaido, 2009).

2.8.3 Cambio del sitio blanco

Una estrategia común para que las bacterias desarrollen resistencia antimicrobiana es evitar la acción del antibiótico al interferir con su sitio objetivo. Para lograr esto, las bacterias han desarrollado tácticas como la modificación del sitio objetivo que resultan en una disminución de la afinidad por la molécula del antibiótico. El modo de acción de los antibióticos betalactámicos y los mecanismos de resistencia basados en cambios en el sitio blanco están íntimamente relacionados con la estructura y la biosíntesis de la pared celular bacteriana. El efecto bacteriostático de los antibióticos betalactámicos está relacionado con sus diversas interacciones y la inhibición concomitante de enzimas dianas (transpeptidasas) involucradas en las etapas terminales de la biosíntesis del peptidoglicano. Estas enzimas dianas asociadas a la membrana citoplasmática se unen a los antibióticos de manera covalente y, por lo tanto, se conocen como proteínas de unión a la penicilina (PBP). La resistencia a los antibióticos betalactámicos en bacterias Gram positivas, en ausencia de una betalactamasa, se debe a diversas modificaciones de estas enzimas PBP. Sin embargo, en las bacterias Gram negativas, tales modificaciones de las PBP son un acontecimiento poco común asociado a la resistencia a betalactámicos. La presencia de una membrana externa es otro factor importante en la actividad de los antibióticos betalactámicos, dado que facilita que los antibióticos pueden difundirse a través de proteínas especializadas denominadas porinas y desde allí ejercer su resistencia, sin necesidad de hacer una modificación del sitio blanco (Cag et al., 2016) (Williamson, Collatz, & Gutmann, 1986).

2.8.4 Degradación del antibiótico (Betalactamasas)

El principal mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos se basa en la destrucción de estos compuestos por acción de enzimas betalactamasas. Estas enzimas destruyen el enlace amida del anillo betalactámico, haciendo que el antimicrobiano sea inefectivo, además, se caracterizan por su capacidad para inhibir determinado subgrupo de betalactámico (Bush, 2013). Es por esto, que algunas subclasificaciones de estas

betalactamasas son denominadas, penicilinasas, cefalosporinasas o carbapenemasas, dependiendo de la familia de betalactámicos al cual hidrolice (Bush, 2013a). Gran parte de estas enzimas suelen ser inactivas por los inhibidores de betalactamasas, conocidos como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Bush & Jacoby, 2010). Se cree que las betalactamasas son el mecanismo de resistencia más común que contribuye a la resistencia generalizada entre los microorganismo Gram negativos (Bush & Jacoby, 2010).

Las betalactamasas se describieron por primera vez a principios de la década de 1940, un año antes de la introducción de la penicilina en el mercado, sin embargo, existe evidencia de su existencia durante millones de años (Abraham & Chain, 1988) (D'Costa et al., 2011). Para esa época, las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a la penicilina se volvieron clínicamente importantes después de que la penicilina se volvió ampliamente disponible y se descubrió que el mecanismo de resistencia era una penicilinasa codificada por plásmidos que se transmitía fácilmente entre las cepas de *S. aureus*, este acontecimiento advirtió sobre la capacidad ingeniosa de los microorganismos por generar mecanismos protectores frente a enzimas que inhibían su actividad demostrando la capacidad de los microorganismos por diseminar rápidamente rasgos de resistencia (Bush, 2013a). Para superar este problema, se fabricaron nuevos compuestos betalactámicos con un espectro de actividad más amplio y menos susceptibilidad a las penicilinasas (como la ampicilina). Sin embargo, durante la década de 1960 ,se encontró una nueva betalactamasa codificada por un plásmido capaz de hidrolizar la ampicilina entre los Gram negativos (denominada TEM-1) (Bradford, 2001). Desde entonces, el desarrollo de nuevas generaciones de antibióticos betalactámicos ha estado acompañado sistemáticamente por la rápida aparición de enzimas capaces de destruir cualquier compuesto novedoso que llegue al mercado, en un proceso que es un excelente ejemplo de la evolución de las bacterias las cuales buscan una nueva adaptación a su entorno impulsadas por el uso de antibióticos (Clatworthy, Pierson, & Hung, 2007).

Los genes que codifican para las betalactamasas se han encontrado tanto en los cromosomas bacterianos como localizados en EGMs como parte del genoma accesorio. Estos genes también se pueden encontrar formando parte de integrones, una situación que facilita su diseminación. En términos de su expresión, la transcripción de estos genes puede ser constitutiva o puede requerir una señal externa para inducir su producción (por ejemplo, el uso excesivo de medicamentos) (Sultan et al., 2018).

2.9 Clasificación de las Betalactamasas

En la actualidad, se utilizan dos sistemas de clasificación para estas enzimas. El primero, la clasificación molecular de Ambler, esquema que se basa en la identidad de la secuencia de aminoácidos, en el cual clasifica a las betalactamasas en 4 grupos (A, B, C y D). Las clases A o D, incluyen a enzimas que hidrolizan sus sustratos mediante la inclusión de una serina en su sitio activo, y las de clase B son metaloenzimas que utilizan un ion de zinc en su sitio activo para facilitar la hidrólisis del betalactámico. El grupo de clase B, se subdivide en tres subgrupos, B1, B2 y B3, según la identidad de la secuencia (Hall & Barlow, 2005). La segunda clasificación, conocida como la clasificación funcional de Bush-Jacoby, está referida de acuerdo a la función bioquímica de la enzima basada principalmente en la especificidad del sustrato, en la cual se divide las betalactamasas en 3 categorías (cada una con varios subgrupos): grupo 1 (clase C) cefalosporinasas; grupo 2 (clases A y D), betalactamasas de amplio espectro, betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y serin carbapenemasas; y grupo 3 (clase B) metalobetalactamasas (Bush & Jacoby, 2010) (Tabla 1-1).

El papel de los diferentes tipos de enzimas betalactamasas y sus características se comprende mejor, teniendo en cuenta la terminología actual que se usa con frecuencia en la literatura. Las BLEE tienen la capacidad de hidrolizar las penicilinas, las cefalosporinas de tercera generación (característica distintiva) y los monobactámicos, pero alberga una actividad moderada (o no) contra las cefamicinas y los carbapenémicos (Rupp & Fey, 2003).

Tabla 1-1: Esquema de clasificación de betalactamasas.

Clasificación de Ambler (molecular)		Clasificación de Bush-Jacoby (Funcional)	Sustrato / Objetivo	Perfil de Inhibición		Característica(s)	Ejemplo de miembros
				CA o TZB	EDTA		
A		2a	Penicilinas	Si	No	Mayor hidrólisis de bencilpenicilina que cefalosporinas.	PC1
		2b	Penicilinas, algunas cefalosporinas de 1° generación	Si	No	Hidrólisis similar de bencilpenicilina y cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
		2be	Cefalosporinas de espectro extendido, Monobactámico	Si	No	Aumento de la hidrólisis de oximino-cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima), aztreonam	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
		2br	Penicilinas	No	No	Resistencia al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-30, SHV-10
		2ber	Cefalosporinas de espectro extendido, Monobactámico	No	No	Aumento de la hidrólisis de oximino-cefalosporinas y aztreonam combinada con resistencia al ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam	TEM-50
		2c	Carbenicilina (carboxipenicilinas)	Si	No	Incremento de la hidrólisis de la carbenicilina	PSE-1, CARB-3
		2ce	Carbenicilina (carboxipenicilinas), cefepima	Si	No	Aumento de la hidrólisis de carbenicilina, cefepima y cefpiroma	RTG-4
		2e	Cefalosporinas de espectro extendido	Si	No	Hidroliza las cefalosporinas. Inhibido por ácido clavulánico pero no aztreonam Aumento de la hidrólisis de carbapenémicos, oximino-cefalosporinas, aztreonam y cefamicinas	CepA
		2f	Carbapenémicos	V	No		KPC-2, IMI-1, SME-1
B	B1	3a	Carbapenémicos	No	Si	Hidrólisis de amplio espectro que incluye carbapenémicos pero no monobactámico.	NDM-1 IMP-1, VIM-1, IND-1
	B2	3b	Carbapenémicos	No	Si	Hidrólisis preferencial de carbapenémicos.	CphA, Sfh-1
	B3	3c					FEZ-1
C		1	Cefalosporinas	No	No	Mayor hidrólisis de las cefalosporinas que la bencilpenicilina; hidroliza las cefamicinas	AmpC, CMY-2, FOX-1, MIR-1
		1e	Cefalosporinas	No	No	Incremento de la hidrólisis de la ceftazidima y, a menudo, de otras oximino-cefalosporinas	GC1, CMY-37
D		2d	Cloxacilina	V	No	Incremento de la hidrólisis de cloxacilina u oxacilina Hidroliza cloxacilina u oxacilina	OXA-1, OXA-10
		2de	Cefalosporinas de espectro extendido	V	No	y oximino-cefalosporinas	OXA-11, OXA-15
		2df	Carbapenémicos	VNo		Hidroliza cloxacilina u oxacilina y carbapenémicos.	OXA-23, OXA-48

CA: ácido clavulánico; TZB: tazobactam; V: variable. Copiado y modificado de: (Bush & Jacoby, 2010).

La mayoría de las BLEE pertenecen a la clase A de Ambler y, generalmente están inhibidas por el ácido clavulánico o el tazobactam (Bradford, 2001). Es importante destacar que esta propiedad los distingue de las enzimas AmpC, que son betalactamasas de clase C que también hidrolizan las cefalosporinas de tercera generación, pero no están inhibidas por el ácido clavulánico o el tazobactam (Jacoby, 2009). Cabe destacar que un subgrupo de enzimas OXA de clase D capaces de destruir cefalosporinas de tercera generación también se consideran dentro del grupo BLEE (Shaikh, Fatima, Shakil, Rizvi, & Kamal, 2015). Otro grupo de enzimas clínicamente relevantes son las carbapenemasas (un grupo diverso de betalactamasas con la capacidad de hidrolizar carbapenémicos), las betalactamasas más potentes disponibles en la práctica clínica. Estas enzimas se pueden dividir en serina carbapenemasas (Ambler clase A o D) y metalo-carbapenemasas (Ambler clase B) (Queenan & Bush, 2007). A continuación se describirán las diferentes clases de betalactamasas partiendo desde la clasificación molecular de Ambler como base:

2.9.1 Betalactamasas de clase A

Tienen un residuo de serina en el sitio catalítico, una propiedad que comparten con las enzimas clase C y D. La mayoría de las enzimas de clase A son inhibidas por el ácido clavulánico y su espectro de actividad incluye monobactámicos pero no cefamicinas (cefoxitina y cefotetan) (Walsh, 2010). Las enzimas de clase A incluyen una amplia gama de enzimas con actividades catalíticas muy diferentes, que abarcan desde penicilinasas (TEM-1 y SHV-1 que solo hidrolizan la penicilina), BLEE (como CTX-M) a carbapenemasas como KPC, ambas enzimas de clase A (CTX-M y KPC) tiene un alto impacto clínico (Queenan & Bush, 2007).

2.9.2 Betalactamasas de clase C

Confieren resistencia a todas las penicilinas y cefalosporinas (aunque la cefepima suele ser un sustrato pobre), incluidas las cefamicinas. No hidrolizan de manera eficiente el aztreonam y no son inhibidos por el ácido clavulánico (Queenan & Bush, 2007). La enzima de clase C más clínicamente relevante es AmpC, que es una cefalosporinasa que generalmente se codifica en el cromosoma (aunque el gen *bla*AMPc también se ha encontrado en plásmidos) (Jacoby, 2009). La producción de AmpC cromosómico es distintiva en bacterias como de *E. cloacae*, *C. freundii*, *Providencia sp*., *Morganella morganii* y *P. aeruginosa*, entre otros. En contraste, *P. mirabilis*, P*. vulgaris* y *Klebsiella*

spp. son ejemplos clásicos de especies en las que el gen *bla*AMPc está ausente del genoma central (Philippon, Arlet, & Jacoby, 2002) (Jacoby, 2009)

2.9.3 Betalactamasas de clase D

Incluye una amplia gama de enzimas que se diferenciaron inicialmente de las penicilinasas de clase A debido a su capacidad para hidrolizar la oxacilina (de ahí su nombre) y porque estaban poco inhibidas por el ácido clavulánico (Poirel, Naas, & Nordmann, 2010). Se han descrito muchas variantes de OXA, incluyendo enzimas con la capacidad de degradar cefalosporinas de tercera generación (por ejemplo, OXA-11 en *P. aeruginosa*) y carbapenémicos (por ejemplo, OXA-23 en *A. baumanii)* (Queenan & Bush, 2007). Se han descrito muchos otros tipos de enzimas OXA hasta la fecha que poseen una variedad de perfiles hidrolíticos y están codificados por genes que a menudo se encuentran en una amplia gama de EGMs. Aunque las enzimas de Clase D son particularmente prevalentes en *A. baumanii*, se han reportado en muchos otros organismos clínicamente relevantes, como *E. coli*, *Enterobacter spp., K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (Walther-Rasmussen & Høiby, 2006).

2.9.4 Betalactamasas de clase B

También se conocen como metalobetalactamasas debido al hecho de que utilizan un ion metálico (generalmente Zinc) como cofactor (en lugar de un residuo de serina) para el ataque del anillo betalactámico. Se inhiben por la presencia de agentes quelantes de iones como el EDTA y, al igual que las carbapenemasas de clase A, son activos contra una amplia gama de betalactámicos, incluidos los carbapenémicos (Queenan & Bush, 2007). Las metalobetalactamasas no son inhibidas por el ácido clavulánico o el tazobactam y, aunque hidrolizan eficazmente las cefamicinas, el aztreonam es típicamente un sustrato pobre (Walsh et al., 2005). Estas enzimas fueron descubiertas hace más de 50 años codificadas por genes que generalmente se encuentran en el cromosoma de bacterias no patógenas. Sin embargo, la situación cambió dramáticamente durante la década de 1990, cuando se informaron cada vez más enzimas como IMP y VIM en cepas clínicas de *Enterobacteriaceae* y *Acinetobacter spp* (Palzkill, 2013). De hecho, los genes que codifican estas enzimas se han encontrado como parte del genoma accesorio de bacterias patógenas que sugieren THG. El grupo de

metalobetalactamasas es diverso, se consideran las familias de IMP, VIM, y NDM como importantes clínicamente (Meini, Llarrull, & Vila, 2014).

2.10 Nueva Delhi Metalobetalactamasa

En el año 2008, se identificó una nueva carbapenemasa en un aislado de *K. pneumoniae* recuperado de un paciente sueco que había sido ingresado previamente en un hospital en Nueva Delhi, India. La enzima fue designada NDM, en referencia a su origen (Nueva Delhi Metalobetalactamasa) (Kumarasamy et al., 2010). El gen *bla*NDM se ha encontrado en varios tipos de plásmidos fácilmente transferibles entre diferentes especies de Gram negativos, y también se ha asociado con la presencia de secuencias de inserción como la ISAba125 (Palzkill, 2013). A diferencia de otros genes que codifican metaloenzimas, *bla*NDM no suele estar relacionado con estructuras de tipo integrón (Nordmann, Poirel, Walsh, & Livermore, 2011).

NDM se extendió rápidamente por todo el mundo, convirtiéndose en un excelente ejemplo de cómo un determinante de resistencia puede diseminarse fácilmente a pesar de los muchos esfuerzos para evitar su transmisión. Además, los genes que contienen EGMs que codifican para enzimas NDM generalmente tienen otros determinantes de resistencia, como genes que codifican otras carbapenemasas (por ejemplo, enzimas de tipo VIM y tipo OXA), BLEE, metilasas que confieren resistencia a los macrólidos, proteínas como Qnr que confieren resistencia a quinolonas, enzimas que modifican la rifampicina y proteínas involucradas en la resistencia al sulfametoxazol, entre otras (Meini et al., 2014). Por lo tanto, la presencia de NDM-1 suele ir acompañada de un fenotipo resistente a múltiples fármacos.

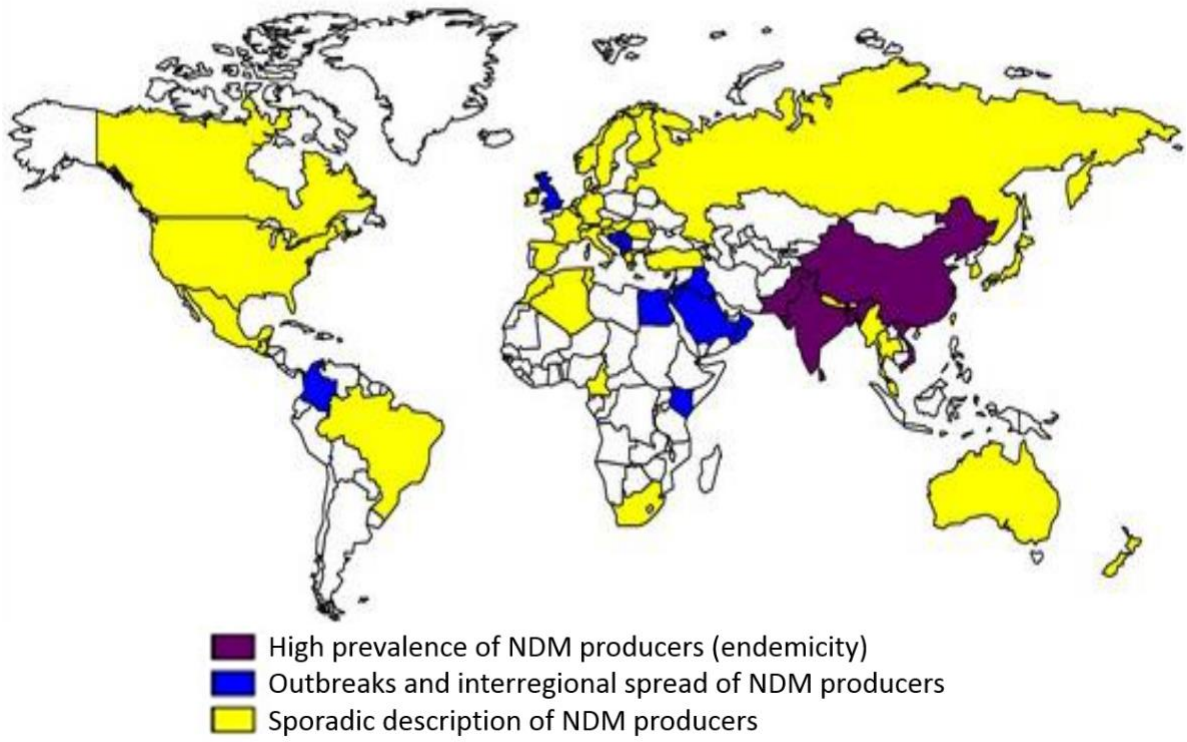
La aparición de NDM-1 es particularmente preocupante porque este gen ha demostrado ser fácilmente transmisible entre diferentes tipos de organismos Gram negativos y se ha extendido a muchos países en un corto período de tiempo (Cornaglia, Giamarellou, & Rossolini, 2011). Además, en el subcontinente indio el gen *bla*NDM no solo se ha diseminado ampliamente entre patógenos nosocomiales, sino que se encuentra con frecuencia en aislamientos asociados a la comunidad. Además, varios informes han demostrado que NDM-1 se puede encontrar en bacterias presentes en el suelo y el agua potable para consumo humano, lo que sugiere que estos genes pueden diseminarse a través de la microbiota humana (Walsh, Weeks, Livermore, & Toleman, 2011).

2.11 Transmisión de Nueva Delhi Metalobetalactamasa

El principal reservorio identificado de enterobacterias productoras de NDM es el subcontinente indio (Pakistán, India y Sri Lanka) (Nordmann, Poirel, et al., 2011). La propagación de los productores de NDM ha sido ampliamente identificada no solo entre los pacientes da la india, sino también a nivel mundial (Figura 2-2). Estos microorganismos inicialmente descritos en la India, se extendieron en sus inicios hasta el Reino Unido (Kumarasamy et al., 2010), posteriormente otros casos fueron notificados en países de Europa, Australia, Japón y Sur África (Struelens et al., 2010) (Poirel, Lagrutta, Taylor, Pham, & Nordmann, 2010) (Chihara, Okuzumi, Yamamoto, Oikawa, & Hishinuma, 2011) (Lowman et al., 2011).

Escenario que fue relevante en las américas hasta el año 2010 donde la diseminación de NDM fue originalmente evidente en los países de Estados Unidos y Canadá (Mulvey, Grant, Plewes, Roscoe, & Boyd, 2011) (Rasheed et al., 2013). En América Latina, no se presentaban reportes de este mecanismo, hasta la notificación de dos aislamientos de *Klebsiella pneumonia*e portadores de NDM en Guatemala (Pasteran et al., 2012). En 2011, ante esta amenaza la Organización Panamericana de la Salud (OPS) expidió una notificación de Alerta epidemiológica en América Latina (OPS, 2011). A partir de este momento, en América del sur se hizo evidente la propagación de esta metalobetalactamasa. En junio de 2012, Uruguay informó sobre tres pacientes hospitalizados por *P. rettgeri* portadora de carbapenemasa de tipo NDM y en noviembre de 2012 Paraguay notificó sobre el hallazgo de carbapenemasas de tipo NDM en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* en pacientes hospitalizados (OPS & OMS, 2014). Estos antecedentes demostraban la circulación emergente a nivel mundial, donde Colombia no era la excepción, en agosto de 2012 se reportó el primer brote de *K. pneumoniae* portador de NDM en seis pacientes hospitalizados en una unidad pediátrica en Bogotá (Escobar Pérez et al., 2013). Ante la diseminación observada en distintos países, la OMS enfatizó en la importancia de la vigilancia y detección de este mecanismo de resistencia debido a que, su aparición incrementaba la morbilidad y mortalidad de las IACS.

Figura 2-2 Distribución geográfica de Enterobacterias productoras de metalobetalactamasa NDM.



Tomado de (Zmarlicka et al., 2015)

Informes recientes han indicado la propagación de NDM-1 y sus variantes (http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1) en muchos países diferentes, incluidos Estados Unidos, Austria, Australia, Noruega, Bélgica, Canadá, Dinamarca, Francia, Alemania, Kenia, Países Bajos, Omán, China, Hong Kong, Taiwán, Singapur, Suecia, Egipto, Japón, Suiza, Marruecos, Kuwait, Italia, Corea del Sur, Irlanda, República Checa, Guatemala, Nueva Zelanda, Israel, Irán, Rusia, Colombia, Malasia, Sri Lanka, Argelia, México, Túnez , isla de la Reunión, Nepal, Mauricio y Honduras (Wei, Yang, Ye, & Li, 2015). Además, la región de los Balcanes como Montenegro, Serbia, Bosnia-Herzegovina y Kosovo, y Oriente Medio (Omán e Irak), pueden constituir una reservorio para los productores de NDM-1, que puede o no haber llegado inicialmente a estos países desde el subcontinente indio (Wei et al., 2015) (Nordmann, Poirel, et al., 2011). Esta situación advierte sobre la respuesta inmediata que deben emitir las entidades de salud y deben considerar como prioridad urgente la investigación de bacterias productoras de NDM, Además, la identificación en el laboratorio

clínico de este tipo de metalobetalactamasas debe ser tomada en cuenta como una directriz importante, así mismo, el conocimiento del entorno genético deberá proporcionar la información necesaria para entender su forma de diseminación. En conjunto, ambas metodologías podrían proporcionar medidas que controlen la propagación y la aparición de posibles brotes con resultados desfavorables para los pacientes.

2.12 Técnicas para la identificación bacteriana y el diagnóstico de perfiles de susceptibilidad

La definición del perfil de susceptibilidad en un aislado bacteriano es de gran importancia para el tratamiento del patógeno en clínica. En la actualidad enfoques tradicionales, necesitan de varios días para la identificación y para las pruebas de susceptibilidad de los patógenos bacterianos, como consecuencia, las decisiones terapéuticas se toman comúnmente de forma empírica hasta la disponibilidad de la identificación de la especie y de los patrones de resistencia (Maurer, Christner, Hentschke, & Rohde, 2017). La aparición de patógenos que llevan determinantes de resistencia adquiridos, como *P. rettgeri* productor de NDM-1 ha dado lugar a regímenes de tratamiento empírico cada vez más amplios, que a menudo incluye glicopéptidos y betalactámicos de amplio espectro, tales como la piperacilina-tazobactam o los carbapenémicos (Maurer et al., 2017). El uso excesivo resultante de estos agentes reservados impulsa aún más la aparición y propagación de organismos multirresistentes. En los últimos años, varias tecnologías nuevas han ingresado en los laboratorios de microbiología clínica: técnicas moleculares, espectrometría de masas mediante MALDI-TOF (De Carolis et al., 2014) y la secuenciación de nueva generación (NGS) (Tagini & Greub, 2017); estas técnicas son prometedores y han demostrado no solo optimizar los flujos de trabajo dentro del laboratorio, sino también ofrecer una resolución diagnóstica y un tiempo de resultado más bajo.

2.13 Tipificación bacteriana

Así como la identificación y la obtención de los perfiles de susceptibilidad son importantes en el estudio de microorganismos, la tipificación bacteriana es una herramienta muy útil en los análisis bacterianos porque permite discriminar entre cepas bacterianas de la misma especie, siendo útil para: 1) confirmar el vínculo epidemiológico en las

investigacionesde brotes, 2) generar hipótesis sobre las relaciones epidemiológicas entre cepas bacterianas, y 3) describir las distribuciones de los tipos bacterianos, identificando los determinantes de esas distribuciones (Foxman, Zhang, Koopman, Manning, & Marrs, 2005). Los sistemas de tipificación tradicionales para discriminar entre bacterias de una sola especie se han basado en fenotipos, (Foxman et al., 2005). Más recientemente, se han desarrollado técnicas basadas en medidas indirectas de secuencia genética, como la Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE), técnica muy laboriosa (Parizad, Parizad, & Valizadeh, 2016); y medidas directas de secuencia genética, como la Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST) y la Tipificación de Secuencia Multilocus Ribosomal (rMLST) (Jolley & Maiden, 2014). En la actualidad, los métodos de tipado basados en datos genómicos como los esquemas MLST y rMLST que se fundamentan en una asignación alélica, presentan una alta resolución para la tipificación de especies (Urwin & Maiden, 2003) (Jolley et al., 2012). El esquema MLST es la metodología más empleado de tipado basado en WGS, sin embargo, para *P. rettgeri* no se han definido los loci o genes de mantenimiento necesarios para realizar un tipado a partir de este metodología. No obstante, el esquema rMLST recientemente descrito, usa para su asignación alélica 53 genes de la proteína ribosomal, teniendo la ventaja de que estos loci están universalmente presentes en todas las especies bacterianas (Jolley et al., 2012). Con datos genómicos disponibles, rMLST puede generar una tipificación de alta resolución e incluso generar datos altamente reproducibles, todo con un único conjunto de loci (Jolley et al., 2012). Estas nuevas tecnologías basadas en el genoma bacteriano han demostrado tener un poder discriminatorio más alto que las técnicas tradicionales, es decir, tienen la capacidad de distribuir las cepas en el mayor número de grupos.

2.14 Secuenciación de Nueva Generación

La implementación en los últimos años de las denominadas tecnologías de secuenciación masiva también conocidas por sus siglas en inglés como *next generation sequencing* (NGS), han permitido obtener millones de secuencias de ADN a una velocidad sin precedentes y a un costo cada vez más bajo (Buermans & den Dunnen, 2014). Las características de esta tecnología contribuyen a mejorar los procesos diagnósticos en múltiples áreas disciplinarias. En la actualidad, la tecnología NGS se está desarrollando en campos como las ciencias biológicas, enfocándose en estudios de numerosos organismos, con el fin, de contribuir con la rápida identificación de nuevas características presentes en

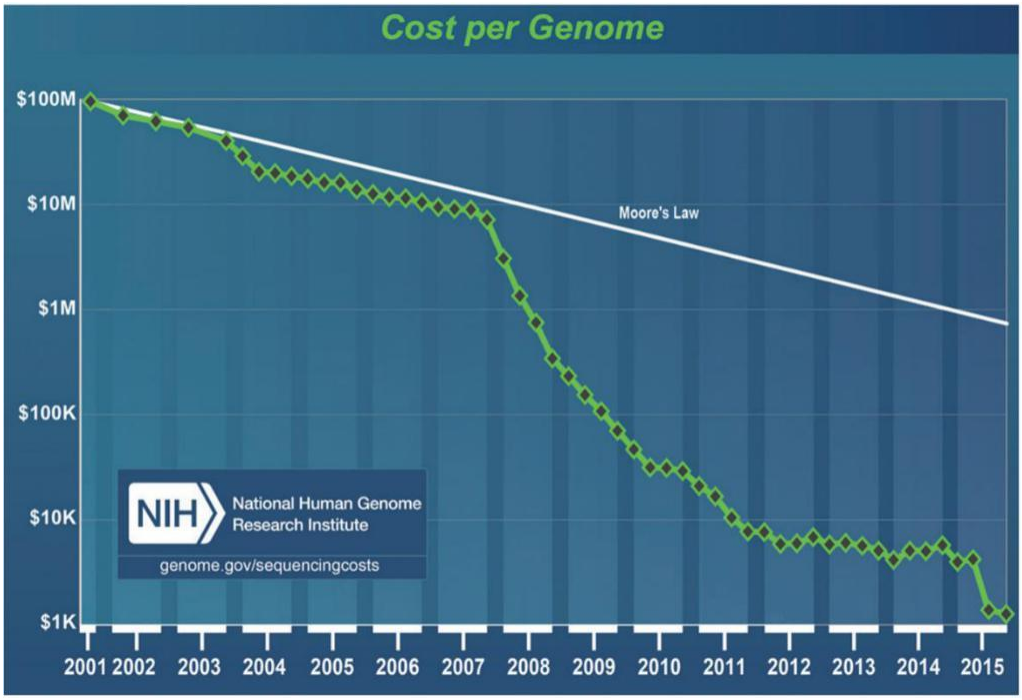
sus genomas (Buermans & den Dunnen, 2014). El implemento de las nuevas tecnologías de secuenciación de ADN, han promovido la secuenciación de los genomas completos (*Whole Genome Sequencing,* WGS) de múltiples organismos, sirviendo como herramienta esencial, para explorar y entender información aún no conocida, de una manera más accesible y con una precisión mayor, comparada con otras técnicas utilizadas en el campo de la biología molecular (da Fonseca et al., 2016).

2.15 Secuenciación del genoma bacteriano en microbiología clínica

Actualmente se ha observado en el ámbito clínico e investigativo, una explosión de datos del genoma bacteriano y se debe al desarrollo de tecnologías de secuenciación de nueva generación, que están evolucionando rápidamente. De hecho, el campo de la genómica microbiana está avanzando a un ritmo muy acelerado (Donkor, 2013). La secuenciación de genomas bacterianos ha mejorado significativamente la comprensión sobre la biología de muchos patógenos, así como la identificación de nuevos objetivos antibióticos. Desde el advenimiento de la secuenciación del genoma hace dos décadas, muchos miles de genomas bacterianos han sido secuenciados, incluyendo representantes de todos los patógenos humanos significativos (Donkor, 2013).

Estas enormes cantidades de datos no solo han permitido avances en la biología fundamental, ayudando a comprender la patogénesis de los microorganismos y su evolución genómica, sino que también han tenido implicaciones para la microbiología clínica (Fournier, Dubourg, & Raoult, 2014). Desde el año 2005, el desarrollo de las plataformas NGS, junto con la disminución de los costos para los secuenciadores (Figura 2-3), han revolucionado la genómica bacteriana. Actualmente, se puede obtener una secuencia de genoma bacteriano en unos pocos días por menos de US $500 (Fournier et al., 2014), y más de 38,000 secuencias de genoma están disponibles en bases de datos públicas (Mukherjee et al., 2018). La NGS ha tenido muchas aplicaciones en microbiología médica, incluyendo el diseño de herramientas de diagnóstico y genotipado, identificación de mecanismos de resistencia y virulencia y el desarrollo de estrategias para abordar los brotes hospitalarios (Fournier et al., 2014).

Figura 2-3 Gráfico costos de secuenciación por genoma.



Este gráfico ilustra la naturaleza de las reducciones en los costos de secuenciación desde el año 2001 al 2015. Tomado de: (Park & Kim, 2016)

Es importante destacar que la detección de determinantes de resistencia bacteriana y la identificación de nuevas disposiciones de genes de resistencia conocidos, así como, nuevos marcadores de resistencia putativos se pueden lograr con WGS (Fournier et al., 2014). Esto podría ayudar a predecir el fenotipo de resistencia, establecer medidas mejoradas de control de infecciones en el hospital, adaptar una terapia específica y permitir la identificación de genes o mutaciones causantes de resistencia en los aislados clínicos, así mismo, podría servir como herramienta de detección de rutina en clínica (Sundsfjord et al., 2004). Las comparaciones genómicas a partir de WGS han permitido la investigación del resistoma, es decir, el repertorio de marcadores genéticos asociados con la resistencia a los antibióticos de cepas resistentes a múltiples fármacos en diversos patógenos (Fournier et al., 2014). Además, la secuenciación del genoma también ha permitido la identificación de mecanismos de resistencia en bacterias de difícil cultivo que expresan pocas características fenotípicas (Fournier et al., 2014)

2.16 Genómica en tiempo real para el diagnóstico en microbiología clínica

La necesidad de implementar WGS en la clínica ha permitido el desarrollo de secuenciadores de mesa como MiSeq (Illumina) y Oxford Nanopore Technologies, estos nuevos secuenciadores permitirían que la secuenciación del genoma sea compatible a futuro con el flujo de trabajo de rutina: clínico-microbiológico (Didelot, Bowden, Wilson, Peto, & Crook, 2012) (Quainoo et al., 2017) . Dicha estrategia permitiría, en unas pocas horas, acceder de forma exhaustiva al genotipo, los marcadores de virulencia y el repertorio de resistencia a los antibióticos (Quainoo et al., 2017).

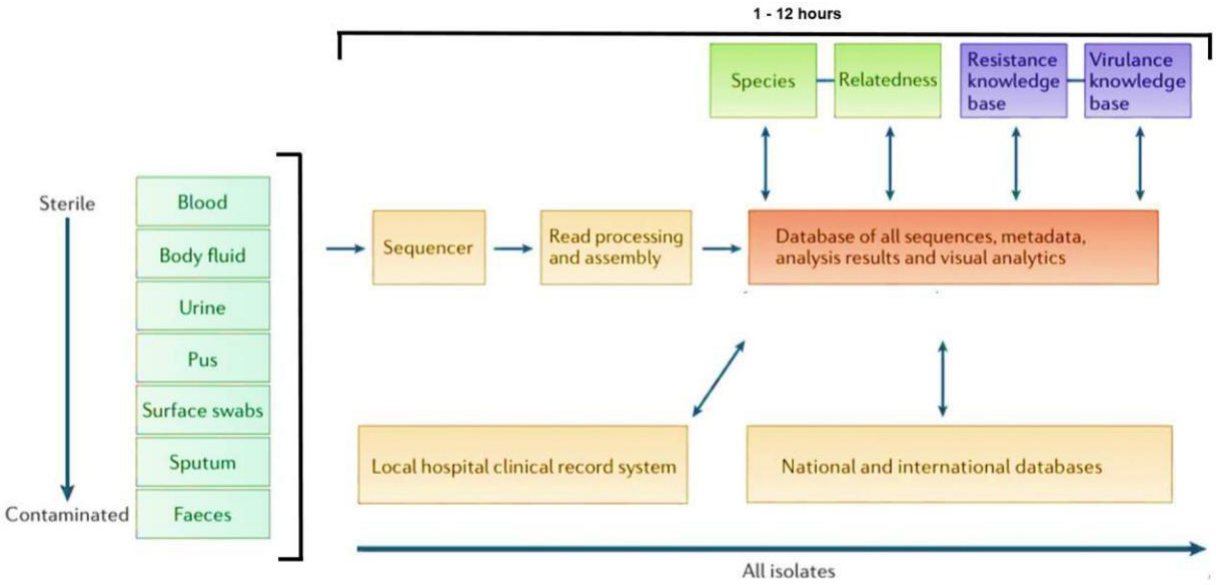
La genómica en tiempo real se ha utilizado notablemente para investigar algunas infecciones nosocomiales o adquiridas en la comunidad (Fournier et al., 2014). En un trabajo realizado en Alemania, Mellmann comparó los genomas de dos cepas de *E. coli* causantes de síndrome urémico hemolítico, el estudio concluyó que las cepas se habían separado de un ancestro común y que la implementación de NGS era apropiada para la caracterización de un patógeno en las fases iniciales de un brote (Mellmann et al., 2011). Así mismo, en el año 2013, Sherry y colaboradores secuenciaron cuatro cepas de *E. coli* MDR para confirmar que el brote que se había producido en una unidad neonatal en Melbourne, Australia, había sido causado por un clon único y para caracterizar los genes de resistencia de la cepa causante del brote (Sherry et al., 2013). En ambos casos, las secuencias genómicas se obtuvieron en unos pocos días (tres y cinco días, respectivamente). Estos hallazgos indican cómo la secuenciación genómica rápida y precisa, podrían transformar el manejo del paciente o mejorar el control de infecciones hospitalarias en la práctica clínica habitual.

En la actualidad, existe evidencia cada vez mayor que muestra que WGS puede proporcionar un método de análisis de brotes y una detección de marcadores de resistencia de manera rápida y asequible con una resolución notablemente más alta que los métodos convencionales (Quainoo et al., 2017). En varios países, como Estados Unidos, Dinamarca, el Reino Unido, Alemania y los Países Bajos, la genotipificación de patógenos basada en WGS se ha implementado como una herramienta de rutina para el monitoreo y detección de patógenos MDR (Zankari et al., 2013) (Köser, Ellington, &

Peacock, 2014) así como, para la detección temprana de brotes (Gilchrist, Turner, Riley, Petri, & Hewlett, 2015)

Aunque muy pocos estudios hasta la fecha han detallado un tiempo de respuesta suficientemente corto para permitir que los datos de WGS influyan en el curso de los brotes y su resistencia (Mellmann et al., 2011) (Sherry et al., 2013). Varios de estos estudios han propuesto flujos de trabajo para la implementación de la genotipificación con WGS en el ambiente hospitalario (Figura 2-4) (Didelot et al., 2012). Además, la utilización de equipos que usan WGS con fines epidemiológicos cada vez es mayor, indicando que la probabilidad de su uso como herramienta de primera línea para rastrear y comprender las epidemias en un futuro próximo.

Figura 2-4 Flujo de trabajo hipotético en microbiología basado en secuenciación de genoma completo.



Tomado y modificado de (Didelot et al., 2012)

2.17 Secuenciación de genoma completo en aislamientos de *P. rettgeri*

En los últimos tiempos, la secuenciación de genomas completos microbianos ha aumentado de una manera considerable. No obstante, son muy pocos los genomas secuenciados de *Providencia rettgeri.* En la base de datos del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI), hasta la última fecha de consulta 21 de Noviembre de 2018, se encontraron secuenciados diecisiete genomas de *P. rettgeri* (Tabla 2-2).

Tabla 2-2 Genomas secuenciados de *P. rettgeri* reportados al NCBI.

Aislamiento	Huésped	Fuente	Publicación	País	Tamaño	NCBI
DSM1131	Homo Sapiens	Heces	22-01-2009	Estados Unidos	4764070	PRJNA29299
Dmel1	Drosophila melanogaster	Hemolinfa	13-11-2012	Estados Unidos	4348650	PRJNA82575
CCBH11880	Homo Sapiens	Herida quirúrgica	19-12- 2014	Brasil	4998020	PRJNA264579
H1736	Homo Sapiens	Hisopado rectal	09-05-2015	Israel	4767940	PRJEB9054
MR4	Abutilon indicum	Tallo planta	05-06-2015	India	3273640	PRJNA283342
729/12	Agua	Aguas residuales	06-07-2016	Brasil	5823310	PRJNA257412
RB151	Homo Sapiens	Orina	10-11-2016	Colombia	4889090	PRJNA342046
PR1	Homo Sapiens	Infección de pie	22-08-2017	Estados Unidos	5257080	PRJNA395387
UBA5024	Metal/Plástico	Metal/Plástico	03-10-2017	Estados Unidos	4188760	PRJNA348753
PR002	Homo Sapiens	Orina	03-10-2017	Sur África	4832620	PRJNA355910
fdaargos_330	Homo Sapiens	Orina	09-03-2018	Estados Unidos	4518600	PRJNA231221
TUM9994	Homo Sapiens	Sin dato	23-05-2018	Japón	4654500	PRJDB6851
AR_0082	Homo Sapiens	Sin dato	10-06-2018	Estados Unidos	4464140	PRJNA292904
Pret_2032	Homo Sapiens	Frotis rectal	12-06-2018	España	5007130	PRJNA470769
NCTC7476	Cepa de colección	Cepa de colección	16-06-2018	Reino unido	4602100	PRJEB6403
NCTC11801	Cepa de colección	Cepa de colección	30-072018	Reino unido	4653530	PRJEB6403
NVIT03	Nasonia vitripennis	Intestino	02-09-2018	Estados Unidos	4397850	PRJNA484797

El primer genoma secuenciado de *P. rettgeri* fue reportado por la universidad de Washington en el año 2009, la secuenciación se realizó a partir de la cepa DSM1131, aislada de heces humanas. Este aislamiento hacia parte de un proyecto de Microbiota Humana, que tenía como objetivo proporcionar a la comunidad científica información útil, como marco de referencia, para el análisis de estudios metagenómicos de la microbiota del intestino humano (Turnbaugh et al., 2007). En el año 2012, Galac y colaboradores realizaron la genómica comparativa de aislamientos de *Providencia* causantes de infección en *Drosophila melanogaster silvestre*, este estudio contribuyó a la secuenciación del segundo genoma de *P. rettgeri*, los análisis reafirmaron la importancia de la genómica comparativa como un paso inicial para encontrar la base genética entre las especies bacterianas (Galac & Lazzaro, 2012). La primera secuenciación de un genoma de *P. rettgeri* en América Latina, fue contribución en el año 2014 del Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ) en Río de Janeiro-Brasil, el microorganismo se aisló de una herida quirúrgica. Este estudio aportó información útil del entorno genético de *bla*NDM, metalobetalactamasa que presenta revuelo entre las instituciones de salud debido a las limitadas opciones de tratamiento y por la carga que representa para los sistemas de atención médica en todo el mundo. Este estudio proporcionó la base para que otras investigaciones, se encaminarán en la comprensión y el conocimiento del perfil de resistencia presentes en aislamientos de *P. rettgeri* portadores de *bla*NDM-1 (Pereira et al., 2015). El estudio realizado por Pereira y colaboradores, demostró que un aislamiento de *P. rettgeri* llevaba junto a *bla*NDM-1 un arsenal de genes de resistencia (aadA1, strA, strB , aadB , aac(6 ')–Ib, qnrD , *bla*OXA-10, ere(A), msr(E), mph(E), floR, catA1, sul1, sul2, tet(A), dfrA1, dfrA8) (Pereira et al., 2015).

En vista de la creciente preocupación por parte de la OMS de investigar este determinante debido a su rápida propagación global, en 2015 el instituto URMITE (*Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes*) de Francia, realizó un análisis detallado de la secuencia del genoma completo de *P. rettgeri* H1736, indicando que la flexibilidad genómica de esta bacteria ha contribuido enormemente a su patogenicidad. Se predijeron varios plásmidos, así como otros EGMs en este aislamiento. El resistoma consistió en un total de 27 genes diferentes de resistencia a antibióticos, incluyendo *bla*NDM-1. El estudio demostró que extensos eventos de transferencia horizontal de genes, llevó a una enorme presencia de EGMs en su genoma y aumentó nuestra comprensión del papel de esta especie en el escenario de resistencia a los fármacos (Olaitan et al., 2015).

En el año 2015, otro genoma de *P. rettgeri* (denominado MR4) fue secuenciado, este fue el primer aislamiento recuperado de una muestra de planta. MR4 fue aislado del tallo de *Abuliton indicum*, una planta proveniente de Kalodungar de Kutch, India; el aislamiento fue escogido dentro de un total de 17 bacterias aisladas de *Abuliton indicum* en base a sus actividades altamente eficaces para promover el crecimiento de las plantas. La secuenciación reveló la asociación de varios genes presentes en la bacteria que respondían al estrés osmótico y oxidativo de la planta y se concluyó que la colonización de *P. rettgeri* en el tejido interno de la planta mostraba beneficiosos y ningún efecto negativo en su huésped (Bhadania, Golakiya, Akbari, Parakhia, & Bhalani, 2015).

Durante el año 2016, en referencia con la problemática mundial, Colombia reportó el primer genoma secuenciado de *P. rettgeri*. El Instituto Nacional de Salud (INS) previamente había reportado la circulación de catorce aislamientos de *P. rettgeri* portadores de NDM-1 en los departamentos de Cundinamarca y Santander (Saavedra-Rojas et al., 2017); ante esta situación, el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad del Bosque, secuenció el aislamiento RB151 proveniente de una muestra de orina de un paciente de la ciudad de Bucaramanga, este estudio reportó la primera secuencia completa de un genoma de *P. rettgeri* dado que hasta la fecha de su publicación, solo habían unos pocos genomas preliminares de *P. rettgeri* disponibles en las bases de datos públicas (Marquez-Ortiz et al., 2017). El resistoma antimicrobiano del cromosoma RB151 incluyó genes de resistencia a aminoglucósidos [aac (3) -Iia, armA y aacA4], betalactamasas (blaTEM-1B y blaOXA-2), fluoroquinolonas [aac (6 ') Ib -cr], sulfonamidas (sul1 y sul2), trimetoprim (dfrA31) y el plásmido pRB151-NDM contenía el gen *bla*NDM-1, que le confirió resistencia a los betalactámicos (Marquez-Ortiz et al., 2017).

Adicionalmente, se ha demostrado la circulación de *P. rettgeri* en muestras ambientales. En Brasil (2016), se secuenció el primer genoma aislado de aguas residuales (729/12) y en Estados Unidos (2017) fue secuenciado un genoma proveniente de metal/plástico (UBA5024) obtenido estudio de metagenoma terrestre. El hallazgo de este microrganismo en este tipo de muestras sugirió que su diseminación a través de estos focos podría facilitar la colonización de estos patógenos rápidamente en la comunidad, situación que podría agravar más la problemática.

Márquez y colaboradores en 2017, demostraron mediante un *Russian doll model* el papel central que desempeña *P. rettgeri* en la difusión de *bla*NDM-1 en América Latina (Marquez-

Ortiz et al., 2017). Teniendo en cuenta la relevancia que los diferentes estudios de genómica le proporcionaban a este patógeno, en 2018 se observó el interés de algunos países como África, Japón, España y Estados Unidos en cuanto a la secuenciación de genomas de *P. rettgeri*, sus estudios empleando diferentes plataformas de secuenciación, proporcionaron con sus trabajos más datos sobre el genoma de este microrganismo. En sus trabajos fueron secuenciados diferentes aislamientos de *P. rettgeri*: PR002, Tum9944, Pret_2032, FDAARGOS_330, AR_0082, y Pr1 (R. F. Potter et al., 2018), todos recolectados de fuentes humanas (orina, frotis rectales e infecciones de piel). Además, el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) proporcionó los genomas secuenciados de dos cepas de colección NCTC7476 y NCTC11801. El último genoma secuenciado hasta la última fecha de consulta 21 de Noviembre de 2018 fue reportado por la universidad de Harvard en Estados Unidos, el aislamiento fue recuperado del intestino de la avispa *Nasonia vitripennis*.

Aunque en la actualidad son diecisiete los genomas secuenciados de *P. rettgeri*, solamente diez de ellos han sido obtenidos a partir de muestras clínicas. Si bien, la información obtenida en estos estudios ha aportado conocimiento del entorno genético de este microorganismo, la información proporcionada es aún limitada; además, si a esta razón se suma la gran alarma mediática mundial por la aparición de enterobacterias portadoras de genes de resistencia como *bla*NDM-1 que acaban con las opciones terapéuticas y teniendo en cuenta los planes instaurados por las instituciones de salud de todo el mundo para abordar la RAM, es necesario implementar el uso de herramientas como la secuenciación de genoma completo para realizar una indagación más profunda de microrganismos como *P. rettgeri.* Esta información contribuirá al seguimiento epidemiológico de los aislamientos circulantes en el entorno colombiano así como aportará información nueva y útil que podrá ser comparada con la información obtenida a nivel local y mundial, contribuyendo de manera positiva el conocimiento genómico de la resistencia y permitiendo una comparación detallada con los sistemas tradicionales de caracterización fenotípica de la resistencia, esta información será de utilidad y apoyará a los sistemas de vigilancia nacional.

3. Metodología

3.1 Aislamientos bacterianos

Para el estudio se seleccionaron 28 aislamientos clínicos de *Providencia rettgeri*, pertenecientes al cepario del laboratorio de Microbiología del INS, obtenidos por el programa de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en IACS. Los aislamientos seleccionados correspondieron a muestras enviadas por hospitales de diferentes departamentos colombianos durante el periodo 2015 – 2016, y a los cuales mediante caracterización genotípica (reacción en cadena de la polimerasa, PCR) se les determinó la presencia del gen *bla*NDM, gen que codifica para la producción de la enzima tipo Nueva Delhi metalobetalactamasa (NDM-1). Estos aislamientos se incluyeron en el proyecto mediante el convenio de cooperación científica y técnica suscrito entre el INS y la Universidad Nacional de Colombia.

3.2 Criopreservación de los aislamientos bacterianos

Los 28 aislamientos de *P. rettgeri* positivos para el gen *bla*NDM-1 fueron enviados en medio de transporte Cary Blair por parte del grupo de microbiología del INS al laboratorio de Epidemiología Molecular (Epimol) de la Universidad Nacional de Colombia. Los aislamientos fueron criopreservados y almacenados en el cepario perteneciente a Epimol. La criopreservación se realizó con medio Skim Milk (Oxoid) al 10% utilizado cultivos masivos en agar Luria Bertani (LB), los crioviales se guardaron a -20 ºC durante 24 horas y luego se almacenaron a -80ºC.

3.3 Identificación microbiológica

Para la confirmación del género, los 28 aislamientos de *P. rettgeri* fueron sembrados en agar MacConkey para la identificación de colonias no fermentadoras de lactosa y en el medio diferencial LEEDS, este medio contiene fenilalanina la cual sirve como sustrato para

las enzimas que pueden desaminarla (siendo el género *Providencia* el único en poseer está característica), esta desaminación forma ácido fenilpirúvico que reacciona con los iones férricos del citrato de amonio férrico presentes en el medio, lo que da como resultado colonias de color marrón oscuro para especies como *Providencia.*

3.4 Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico de las cepas de *Providencia rettgeri*, se inocularon caldos LB de 10 ml con colonias únicas de cada aislamiento y se incubaron a 37ºC en agitación constante a 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.6 a 0.8 (600 nm) ~4 horas. Posteriormente, se tomaron los 10 ml del caldo LB previamente inoculado y se pasaron a tubos Falcon, se centrifugaron a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C y el pellet bacteriano obtenido se lavó dos veces con TE (Tris HCL 10mM – EDTA 5mM).

A continuación se realizó la extracción del ADN genómico utilizando dos kits comerciales, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Anexo A-1): QIAamp® DNA mini kit (Qiagen) para los aislados GMR-RA14, GMR-RA15, GMR-RA43, GMR-RA180, GMR-RA181, GMR-RA218, GMR-RA951, GMR-RA953, GMR-RA1080, GMR-RA1153, GMR-RA13616 y GMR-RA2216 y PureLink® Genomic DNA Kit (Thermo Fisher Scientific / Invitrogen) para los aislados GMR-RA257, GMR-RA278, GMR-RA437, GMR-RA454, GMR-RA555, GMR-RA649, GMR-RA767, GMR-RA1048, GMR-RA1151, GMR-RA1152, GMR-RA7716, GMR-RA38516, GMR-RA42816, GMR-RA43816, GMR-RA44516 y GMR-RA46616.

El ADN obtenido de cada uno de los aislados de *P. rettgeri* fue cuantificado con el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000C (Termo scientific) obteniendo los datos de concentración de ADN en ng/uL y la relación de absorbancias 260/280 nm como índice de calidad y su extracción fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % preparado en buffer TAE (Tris-Borato-EDTA) 1X, en un corrido electroforético a 80 V por 45 min. En la electroforesis se colocó un marcador cuantitativo HyperLadderTM 1 kb Plus (Bioline) para determinar la concentración de DNA. Finalmente, se visualizaron las bandas de DNA genómico en presencia de bromuro de etidio a una concentración de 0,5 g / ml con el fotodocumentador (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Imaging System - Bio-rad) mediante el programa Image Lab 5.2.1.

3.5 Identificación molecular

Se realizó la identificación del género y la especie de cada uno de los aislamientos mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA. Para esto, inicialmente se obtuvo el ADN de cada uno de los aislamientos por medio de la extracción descrita en el numeral 2.4. Para la amplificación del gen 16S rRNA, se utilizaron los cebadores universales Forward 27F 5 'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' y Reverse 1492R 5 'TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3', reportados previamente (Trivedi et al., 2015). La PCR se llevó a cabo utilizando las concentraciones que se describen en la tabla 3-1.

Tabla 3-1 Concentraciones PCR y mezcla final para amplificación del gen 16S rRNA

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Mezcla 50 µl
Agua grado HPLC	-	-	39 µl
Buffer	10x	1x	5 µl
$MgCl_2$	50mM	1.5mM	1.5 µl
dNTPs	10mM	0.2mM	1.0 µl
Primer F	5µM	0.5µM	1.0 µl
Primer R	5µM	0.5µM	1.0 µl
Taq polimerasa	5U/µL	0.02U/µL	0.5 µl
ADN	-	-	1.0 µl

La amplificación se realizó en el termociclador Bio-Rad 582br icycler 96well Thermal Cycler PCR ADN Amplificador, bajo las siguientes condiciones:

Etapa	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización	94°C	2 min	
Desnaturalización	94°C	45 seg	30 ciclos
Anillamiento	55°C	1 min	
Elongación	72°C	3 min	
Elongación final	72°C	15 min	

Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1% resuspendidos en buffer TAE 1X, en presencia de bromuro de etidio, después de un corrido electroforético a 100 V por 40 minutos y utilizando como referencia de peso, el marcador cuantitativo HyperLadderTM 1 kb Plus (Bioline), para la estimación del tamaño de las bandas obtenidas. La visualización se realizó en el fotodocumentador (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Imaging System - Biorad) con el programa Image Lab 5.2.1.

Para la secuenciación del gen 16S rRNA, una vez confirmado el tamaño del amplificado (~1.5 kb), este se purifico mediante precipitación con acetato de sodio 3M (pH 5,2) y etanol absoluto (Anexo A-2). Los fragmentos obtenidos de ADN se cuantificaron con el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000C (Termo scientific). Los fragmentos purificados fueron enviados a secuenciar utilizando los primers 27F y 1492R mediante la metodología BigDye, siguiendo el protocolo del fabricante (Applied Biosystem, Foster City, Estados Unidos) en el Servicio de Secuenciación del Instituto de genética, de la Universidad Nacional de Colombia utilizando el equipo ABI 3500 Genetic Analyzers Hitachi. Para el análisis de los cromatogramas se utilizó el programa Chromas (Technelysium Pty Ltd.). Los datos obtenidos de las secuencias de rRNA se alinearon y se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos del Banco de genes del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) utilizando el algoritmo BLASTn, con el fin de comparar los fragmentos secuenciados con los existentes en esta base de datos.

3.6 Caracterización fenotípica de susceptibilidad en aislamientos de *P. rettgeri*

La caracterización fenotípica de la susceptibilidad a los antibióticos se realizó empleando el método de difusión en disco Kirby-Bauer (Anexo A-3). Para ello, se evaluó para la categoría antibióticos betalactámicos los discos; asociados a carbapenémicos: ertapenem (ERT), imipinem (IMI), meropenem (MEM); cefalosporinas: cefoxitina (FOX), ceftazidima (CAZ), cefotaxime (CTX), cefepima (FEP); monobactámicos: aztreonam (ATM) y penicilinas: piperacilina / tazobactam (TZP). Así mismo, se evaluaron discos asociados con antibióticos no betalactámicos como; fluoroquinolonas: ciprofloxacina (CIP);

aminoglucósidos: gentamicina (GM), amikacina (AK) y Sulfonamidas/diaminopirimidinas: trimetoprima / sulfametoxazol (SXT). Los resultados de susceptibilidad se interpretaron de acuerdo con los criterios establecidos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute) reportados anualmente (CLSI, 2015). La discriminación entre betalactámicos y no betalactámicos se realizó empleado los antibióticos que en clínica son principalmente usados para el tratamiento de infecciones por enterobacterias

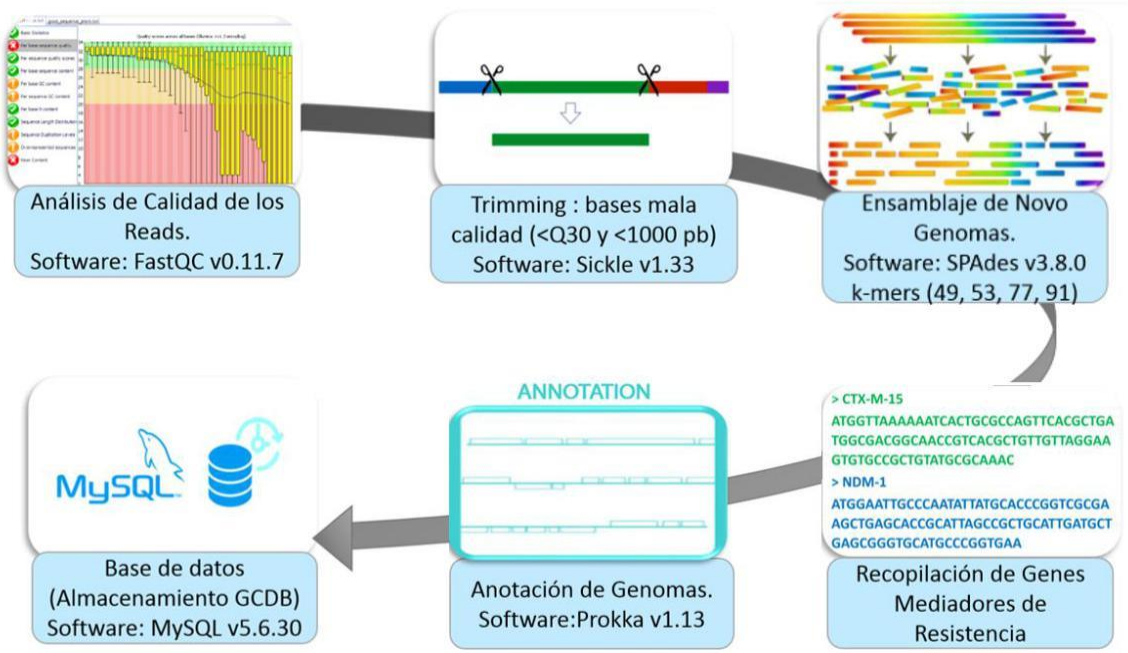
3.7 Detección fenotípica de carbapenemasas

La detección fenotípica de carbapenemasas se realizó utilizando el test de Hodge modificado (THM), las pruebas de sinergia de doble disco usando inhibidores específicos para carbapenemasas clase B (ácido etilendiaminotetraacético/ácido mercaptoacético [EDTA/SMA]) y para carbapenemasas clase A (ácido fenil borónico [APB]) (Anexo A-4). Para el THM, la cepa de referencia *Escherichia coli* ATCC 25922 se usó como organismo indicador (CLSI, 2015).

3.8 Secuenciación del genoma completo de aislamientos de *P. rettgeri*

El ADN genómico de los aislamientos de *P. rettgeri* se obtuvo utilizando dos kits comerciales, como se describió en el numeral 2.4. La cuantificación de ADN para la secuenciación de genoma completo fue estimada mediante el método picogreen, utilizando fluorometría Victor 3. Para la construcción de las librerías se utilizó el kit TruSeq Nano DNA (Illumina). La secuenciación de extremos pareados (Paired-End), se realizó con el secuenciador de nueva generación (NGS) Illumina Hiseq 2500. Los *reads* de cada genoma de *P. rettgeri* .fastq 1 (Forward) y .fastq 2 (Reverse) fueron evaluados mediante un flujo de trabajo bioinformático, desarrollado en el Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (Figura 3-1).

Figura 3-1 Flujo de trabajo Bioinformático para el ensamblaje y la anotación de los genomas de *P. rettgeri*.



3.9 Análisis de calidad de los reads

Lecturas de baja calidad fueron eliminadas para evitar desajustes en la asignación de lectura y rutas erróneas durante el proceso de ensamblaje del genoma. Para ello se empleó un paquete NGS QC (*Next Generation Sequencing, Quality Control*), conocido como FastQC v0.11.7 (Andrews, 2013), herramienta de control de calidad para datos de secuencia de alto rendimiento. Para evaluar la calidad (Q) de las secuencias por base, la distribución de la longitud (pb) de las secuencias y la presencia o ausencia de adaptadores se utilizaron las métricas de control de calidad y un informe de evaluación en representación gráfica. Los *reads* con un Q menor a 30 (<Q30), lecturas con tamaños menores a 100 pb (<100 pb) y adaptadores, los cuales pueden ser un interferente con los futuros análisis fueron localizados en los archivos fastq 1 (Forward) y .fastq 2 (Reverse) para su posterior eliminación.

3.10 Trimming de reads de baja calidad

Posteriormente al análisis de calidad, se utilizó la herramienta Sickle v1.33 (*quality-based-trimming*) (Joshi & Fass, 2011) con el fin de eliminar los *reads* de baja calidad (<Q30 y <100 pb), los adaptadores y las bases incorrectamente llamadas en los reads que deterioraban la calidad de las secuencias. En los dos archivos emparejados .fastq 1 (Forward) y .fastq 2, (Reverse), se determinaron los umbrales de longitud y calidad para el recorte. Al final el programa generó un archivo de salida con los reads en las condiciones adecuadas.

3.11 Ensamblaje de novo para los genomas de *P. rettgeri*

Una vez se obtuvieron los reads en condiciones apropiadas se ejecutó el ensamblaje de novo para los 28 aislamientos de *P. rettgeri* mediante el algoritmo de ensamblaje de genoma SPAdes v 3.8.0 (Bankevich et al., 2012), diseñado para conjuntos de datos bacterianos. SPAdes utiliza k-mers para construir el gráfico inicial de Bruijn y en las siguientes etapas realiza operaciones teóricas de gráfico que se basan en la cobertura y las longitudes de secuencia. En consecuencia para los genomas de *P. rettgeri* se usaron los k-mers (49, 53, 77, 91). Posteriormente, se evaluó la calidad del ensamblaje de los genomas con la herramienta QUAST (Gurevich, Saveliev, Vyahhi, & Tesler, 2013), este programa permite evaluar y comparar conjuntos de genomas. QUAST produjo una tabla de resumen y un gráfico donde se especifica las estadísticas del ensamblaje, muestra los datos relacionados con: Número de contigs, profundidad, longitud total de las secuencias, porcentaje de G/C y N50 (Anexo C-2).

3.12 Anotación genomas de *P. rettgeri*

3.12.1 Recopilación y agrupación de genes asociados con resistencia a diversos antibióticos

Para garantizar una anotación e identificación detallada de los genes asociados con resistencia y con el fin de obtener información completa, recopilada y agrupada de estos genes, el grupo de investigación del Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología

(Universidad Nacional de Colombia) desarrolló el siguiente flujo de trabajo: a) búsqueda de genes asociados con resistencia a una amplia variedad de antibióticos reportados en la literatura indexada; b) recolección de la información de los genes y almacenamiento en una base de datos en Excel, la base incluyó información de las secuencias de nucleótidos y de las secuencias de proteínas, agrupando cada gen en los diferentes mecanismos de resistencia reportados en la literatura: Degradación y modificación, Bombas de Eflujo, Porinas y Cambio del Sitio Blanco.

Una vez realizada esta consulta se determinó mediante revisión de literatura indexada las bases de datos especializadas en la identificación de genes de resistencia disponibles a nivel de bacterias Gram negativas, las bases elegibles y descargadas fueron: Resfam (Gibson, Forsberg, & Dantas, 2015) (base de datos curada de familias de proteínas asociada con modelos ocultos de Markov (HMM) y confirmadas para la función de resistencia a antibióticos y CARD (McArthur et al., 2013) (base de datos de resistencia que contiene datos de referencia de alta calidad sobre la base molecular de la resistencia antimicrobiana). Esta recopilación de genes de resistencia y búsqueda de base de datos fue empleada para enriquecer el programa de anotación Prokka v1.13 con el fin de mejorar la identificación de genes relacionados con resistencia a antibióticos

3.12.2 Anotación de elementos genómicos mediadores de resistencia

Para la anotación de los genomas (proceso de identificar y etiquetar todas las características relevantes en una secuencia genómica) se utilizó el programa Prokka v1.13 (Seemann, 2014), el cual fue seleccionado dado que permite la incorporación de bases de datos externas, en este caso el anotador Prokka fue previamente enriquecido con una recopilación de genes de resistencia realizada por el grupo de investigación (ver numeral 2.12.1) y dos diferentes bases de datos especializadas en resistencia (Resfam, CARD) numeral 2.12.1. La incorporación de las bases de datos, garantizó un análisis robusto para la identificación de diversos genes asociados con resistencia bacteriana. Para el análisis, Prokka empleó herramientas de predicción de características externas para identificar las coordenadas de las características genómicas dentro de contigs (Seemann, 2014). Estas herramientas se enumeran en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2 Herramientas de predicción de funciones utilizadas por Prokka.

Herramienta (referencia)	**Características predichas**
Prodigal (Hyatt et al., 2010)	Secuencia de codificación (CDS)
RNAmmer (Lagesen et al., 2007)	ARN ribosomal genes (rRNA)
Aragorn (Laslett & Canback, 2004)	ARN Transferencia genes
SignalP (Petersen, Brunak, von Heijne, & Nielsen, 2011)	Péptidos Señal
Infernal (Kolbe & Eddy, 2011)	ARN no-codificante

Tabla tomada y modificada de (Seemann, 2014).

Las proteínas que codifican los genes se anotaron en dos etapas: 1) Prodigal identificó las coordenadas de los genes candidatos, pero no describió el producto genético putativo. 2) Predicción de la codificación de un gen al compararlo con bases de datos de resistencia de secuencias conocidas (Seemann, 2014). Esta segunda etapa la realizó de manera jerárquica, comenzando con la base de datos confiable más pequeña, moviéndose a bases de datos medianas pero de dominio específico, y finalmente a modelos curados de familias de proteínas. El modelo jerárquico del uso de las bases de datos para la anotación se describe a continuación:

1) Utilización del conjunto opcional de proteínas anotadas proporcionado por el usuario: recopilación de genes de resistencia y bases de datos de resistencia (Resfam, CARD) (Ver numeral 2.12.1).

2) Todas las proteínas bacterianas en UniProt (Apweiler et al., 2004) que tienen evidencia funcional de proteína.

3) Todas las proteínas de genomas bacterianos en formato RefSeq para un género específico.

4) Una serie de bases de datos de proteínas representadas por perfiles ocultos de Markov, que incluyen Pfam (Punta et al., 2012) y TIGRFAMs (Haft et al., 2013)

Una vez Prokka comparó los genes frente a grandes bases de datos, generalmente a nivel de secuencia de proteínas, la anotación de la mejor coincidencia significativa fue trasferida. En el caso de no encontrar coincidencias, el gen se etiquetó como 'proteína hipotética'. Al finalizar la anotación Prokka produjo varios archivos en el directorio de salida: .fna (FASTA file of original input contigs (nucleotide); .gbk (Genbank file containing sequences and annotations) .gff (GFF v3 file containing sequences and annotations) .txt (Annotation summary statistics) los cuales fueron utilizados en los diferentes análisis.

3.13 Base de datos: Almacenamiento MySQL

Una vez se realizó la anotación, el grupo de investigación creó una base de datos con el sistema MySQL (sistema de gestión de bases de datos relacional (RDBMS) de código abierto, basado en el lenguaje de consulta estructurado (SQL), con el fin de almacenar la información obtenida de los aislamientos de *P. rettgeri*, esta comprendió: a) perfiles de susceptibilidad por los métodos fenotípicos; b) datos sociodemográficos proporcionada por el grupo de Microbiología del INS y c) los archivos obtenidos durante el proceso de anotación (.fna, .gbk, .gff, .txt).

3.14 Obtención de genes de resistencia

Para la extracción de los genes asociados con resistencia de los aislados de *P. rettgeri*, el grupo de investigación diseño un Script (Anexo B) que permitió sustraer los genes de resistencia de la base de datos relacional MySQL a la cual se le había proporcionado los resultados de la anotación, el script adicionalmente construía una matriz con los identificadores de los aislamientos (filas) versus los genes y sus secuencias de nucleótidos (columnas). Una vez el script era ejecutado en el sistema operativo Linux, se generó un archivo de salida en Excel que incluía la siguiente información por genoma: Código del aislamiento, año, municipio, departamento, gen, mecanismo de resistencia asociado, contig, pos_inicio, pos_final, secuencia de nucleótidos y secuencia de proteínas, a partir de esta tabla se realizó el análisis de resistencia.

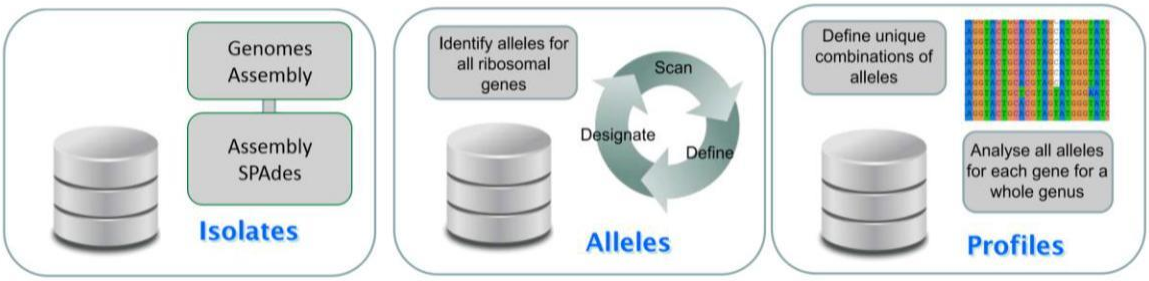
3.15 Análisis genómico comparativo

Para el análisis genómico comparativo, se utilizaron los 28 genomas del estudio de *Providencia rettgeri* y 16 genomas de *Providencia rettgeri* disponibles en el GenBank: 14 genomas de referencia: (RB151, H1736, CCBH11880, FDAARGOS_330, MR4, 729-12, UBA5024, ARBA0024, TUM9994, Dmel1, DSM1131, PR1, Pret_2032, PR002) y 2 cepas de colección: (NCTC11801, NCTC74801).

3.16 Tipificación de aislamientos de *P. rettgeri*

Debido a que no existe un esquema MLST para la caracterización filogenética de aislados de *P. rettgeri*, se empleó el esquema rMLST (Tipificación de Secuencia Multilocus Ribosomal) descrito recientemente por Jolley (Jolley et al., 2012) y alojado en el sitio web PubMLST https://pubmlst.org/rmlst/ para la tipificación de los aislados del estudio. Esta metodología indexa la variación de 53 genes que codifican las subunidades proteicas del ribosoma bacteriano (genes rps), teniendo la ventaja de que estos loci están universalmente presentes en todas las especies bacterianas. La variación alélica rMLST se cataloga utilizando la plataforma BIGSdb: base de datos escalable y de código abierto que permite almacenar secuencias y definiciones alélicas para loci definidos (Jolley & Maiden, 2010). Para este estudio, el esquema rMLST identificó las secuencias de nucleótidos de los genes (*rps, rpl, rpm*) de los genomas anotados, definió los alelos únicos para cada uno de estos genes en función de su secuencia de nucleótidos y asignó a cada genoma un número de tipo de secuencia ribosomal (rST) personalizado definido por el perfil alélico de la combinación numérica (Figura 3-2) obteniéndose los rSTs del estudio.

Figura 3-2 Tipificación de Secuencia Multilocus Ribosomal (rMLST).



Tomado y modificado de: Ribosomal MLST: Universal Bacterial Typing using Whole Genome Sequences https://zoo-maidenlab.zoo.ox.ac.uk/wp-content/uploads/2015/05/James_ABPHM2015_RibosomalMLST_2.pdf

3.17 Pan-genoma y construcción árbol filogenético.

El pan-genoma de los genomas de *P. rettgeri* se infirió con Roary versión 3.7.0 (Page et al., 2015). Roary produjo una matriz de presencia / ausencia de genes, una alineación multi-FASTA de genes centrales utilizando PRANK versión 0.140603 (Löytynoja, 2014) y un árbol filogenético basado en la presencia y ausencia de genes centrales y accesorios entre los taxones utilizando FastTree versión 2.1.9 (Price, Dehal, & Arkin, 2009).

3.18 Visualización comparativa circular del genoma completo.

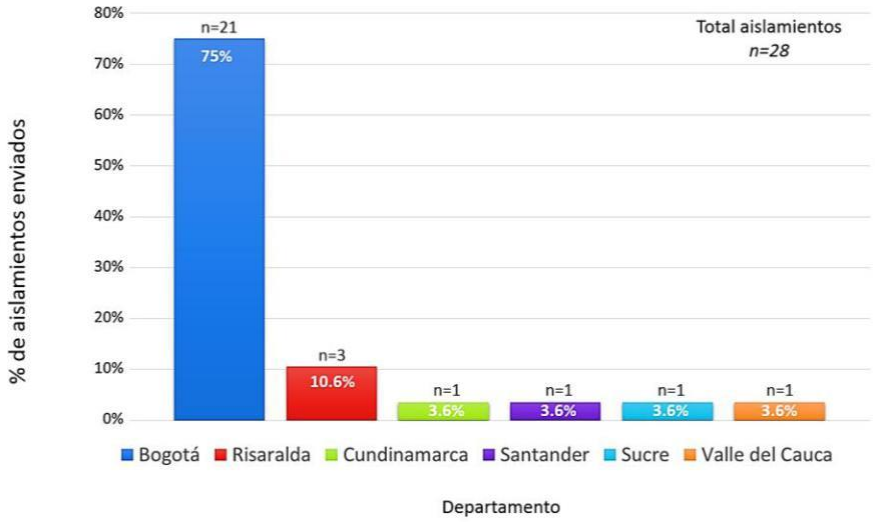
Las comparaciones genómicas circulares entre los genomas de los rST mayoritarios (rST-63073 y rST-61696) y los genomas de referencia FDAARGOS_330 y PR002 fueron generados mediante el software BRIG (*BLAST Ring Image Generator*) versión 0.95 (Alikhan, Petty, Ben Zakour, & Beatson, 2011), este programa emplea alineamientos con BLASTN que permiten comparar los genomas del estudio mostrando una amplia visualización de la identidad de las secuencias codificantes.

4. Resultados

4.1 Aislamientos clínicos

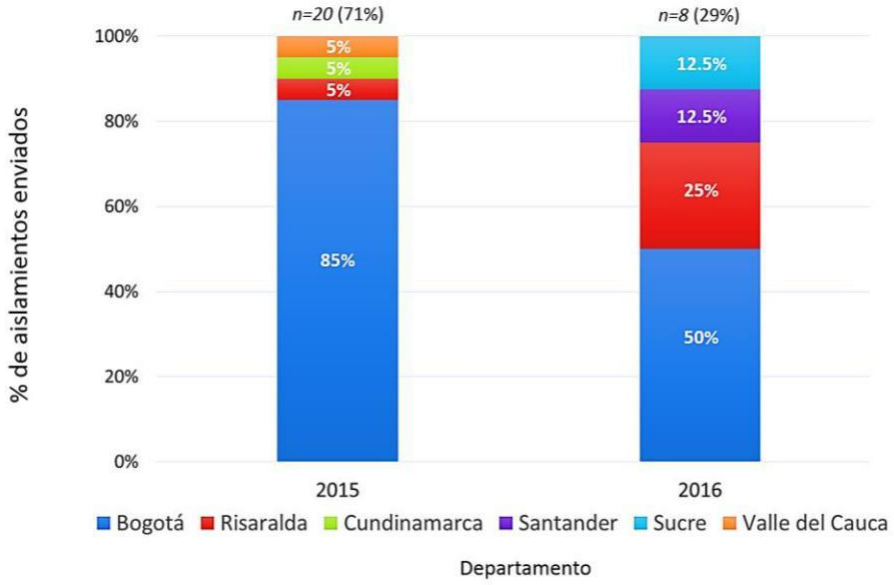
Durante el periodo de 2015-2016, 28 aislamientos de *P. rettgeri* fueron obtenidos por parte del programa de vigilancia por laboratorio de resistencia a los antimicrobianos en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IACS), los cuales presentaban susceptibilidad reducida a los carbapenémicos y como característica fundamental contenían el gen *bla*NDM-1, identificado mediante técnicas moleculares (PCR) por el INS (ver materiales y métodos). La ciudad de Bogotá, presentó el mayor número de muestras enviadas (n=21; 75%), seguida del departamento de Risaralda, municipio Pereira (n=3; 10.6%), los demás envíos se realizaron por los departamentos de Cundinamarca - municipio Zipaquirá (n=1; 3.6%), Santander - municipio Floridablanca (n=1; 3.6%), Sucre - municipio Sincelejo (n=1; 3.6%), y Valle del Cauca - municipio Cali (n=1; 3.6%) enviando un aislamiento por departamento (Figura 4-1).

Figura 4-1 Porcentaje de aislamientos de *P. rettgeri* enviados por departamento.



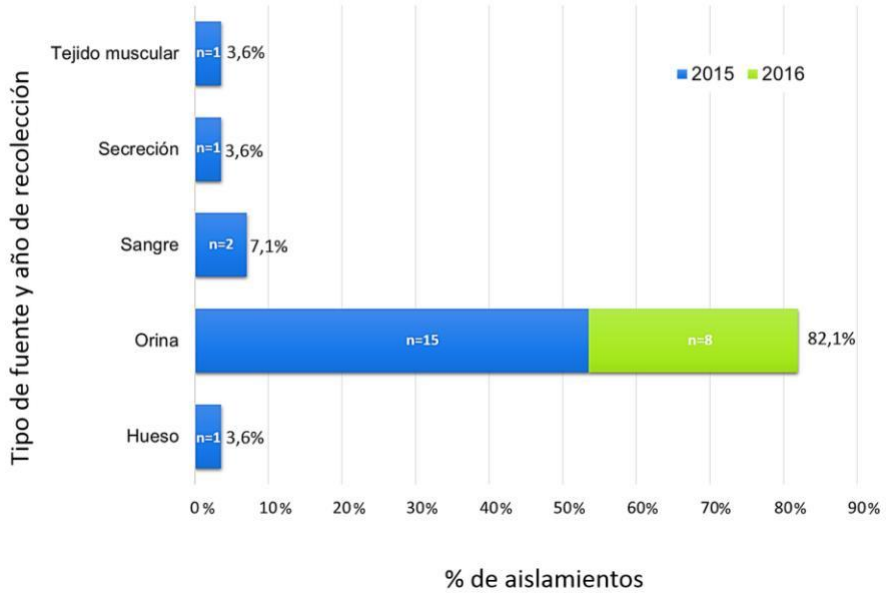
De los 28 aislamientos recibidos de *P. rettgeri*, 20 aislamientos correspondieron al año 2015 (71%) y 8 (29%) aislamientos al año 2016 (Figura 4-2). Durante el año 2015, la ciudad de Bogotá envió el 85% de las muestras, seguido de los departamentos de Risaralda, Cundinamarca y Valle del Cauca con el 5% de envió respectivamente. Así mismo, durante el año 2016 Bogotá fue la ciudad con más envíos realizados (50%) seguido de Risaralda (25%), Santander (12.5%) y Sucre (12.5%). Las ciudades de Bogotá y Santander son las únicas ciudades que enviaron muestras durante los dos periodos de recolección (Figura 4-2).

Figura 4-2 Porcentaje de aislamientos de *P. rettgeri* enviados por año de recolección y departamento.



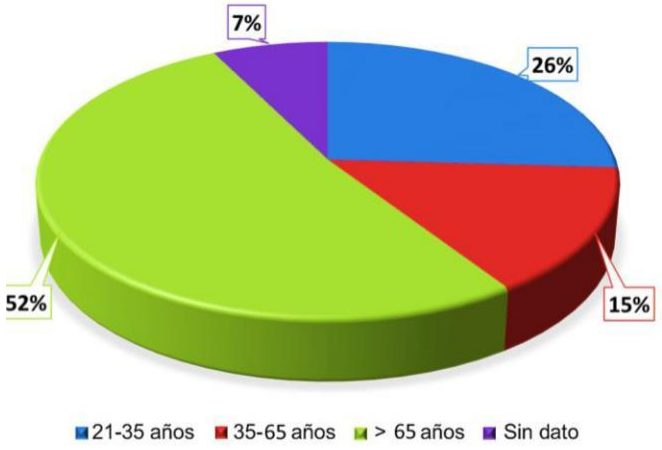
Los tipos de muestra en los que se aislaron *P. rettgeri* se representan en la Figura 4-3. La muestra mayoritaria para los dos años de estudio correspondió a orina 82.1% (n=23) seguida de las muestras en sangre 7.1% (n=2), y en menor proporción de tejido muscular 3,6% (n=1), secreción 3,6% (n=1) y hueso 3,6% (n=1). Cabe destacar que durante el año 2016, el 100% de las muestras recolectadas procedieron de orina.

Figura 4-3 Aislamientos de *P. rettgeri* por tipo de fuente y año de recolección.



El rango de edad de los pacientes osciló entre 21 y 91 años, con una media de edad de 60,2 años. El grupo de edad formado por los pacientes mayores de 65 años fue el grupo en el cual se obtuvo el mayor número de aislamientos de *P. rettgeri* (Figura 4-4). Cabe destacar que de los 28 aislamientos recibos entre 2015 y 2016, 27 fueron recolectados de pacientes masculinos y tan solo 1 aislamiento de un paciente femenino, representando la población masculina el 95% de las infecciones.

Figura 4-4 Grupos de edad de los pacientes en los que se aisló *P. rettgeri.*



4.2 Identificación microbiológica

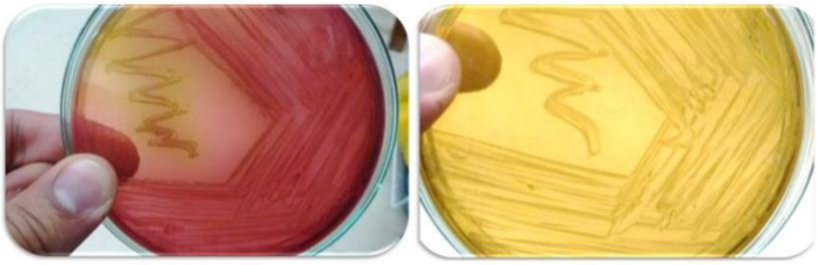
Los 28 aislamientos de *P. rettgeri* no fermentaron lactosa en agar MacConkey (Figura 4-5) y en agar LEEDS las colonias presentaron una coloración marrón (Figura 4-6), lo que precisaba que los aislamientos enviados por el INS desaminaban la fenilalanina, característica esencial en especies de P*rovidencia*; con esta caracterización además de discriminar el género de los aislamientos, se aseguró la pureza de los mismos, observando en cada aislamiento, la presencia de una única población.

Figura 4-5 Crecimiento de colonias de *P. rettgeri* en agar MacConkey.

Control Positivo *Escherichia coli* **ATCC 25922** | **Aislamiento** *Providencia rettgeri* **GMR-RA 278**

En la figura se observa a la izquierda control Positivo de *Escherichia coli* ATCC 25922, colonias de color rosa muestran la capacidad del microorganismo para fermentar lactosa. A la derecha aislamiento GMR-RA 278 se observan colonias incoloras, característica que describe un aislamiento no fermentador de lactosa.

Figura 4-6 Crecimiento de colonias de *P. rettgeri* en agar LEEDS.



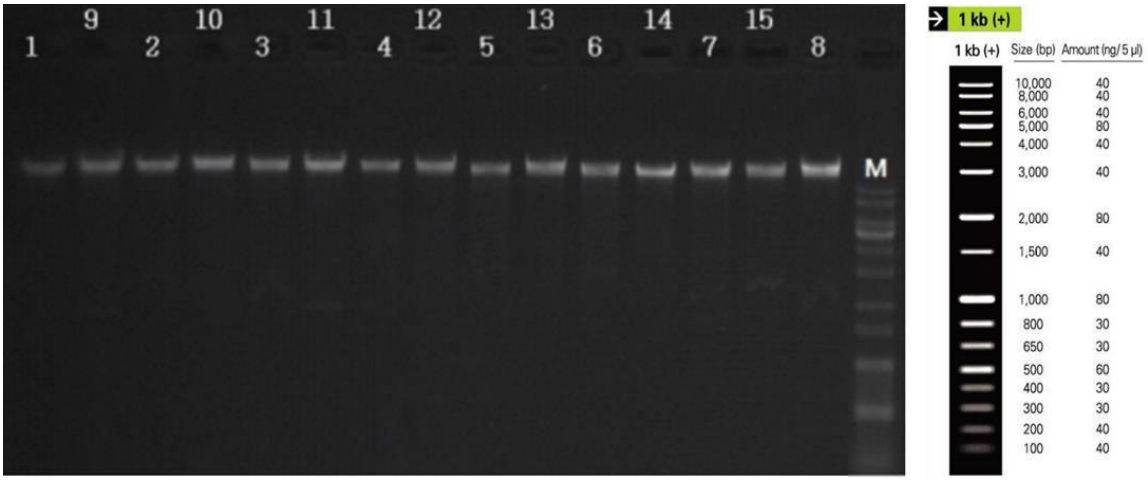
Control Positivo *Acinetobacter baumannii* **ATCC BAA-1605** | **Aislamiento** *Providencia rettgeri* **GMR-RA 385.16**

En la figura se observa a la izquierda control Positivo de *Acinetobacter baumannii* ATCC BAA-1605, colonias de color rosa determinan la liberación de iones de amoniaco por *Acinetobacter*. A la derecha aislamiento GMR-RA385.16, la fenilalanina se desamina formando ácido fenilpirúvico que reacciona con iones férricos del citrato de amonio férrico, esto da como resultado colonias de color marrón oscuro para especies como *Providencia.*

4.3 Extracción ADN genómico

El ADN genómico obtenido de *P. rettgeri* mostró en el corrido electroforético bandas bien delimitadas y sin *smear* (Figura 4-7), este resultado indicó una buena calidad del ADN. Por otra parte, se realizó la cuantificación mediante espectrofotometría para evaluar la concentración, y la pureza; los resultados demostraron un adecuado rango, para la relación de absorbancias 260/280, el promedio obtenido entre todos los aislados fue de 1,9 [intervalo esperado: 1.8 – 2.0] (una relación más baja indica contaminación con proteínas o fenoles), mientras que dentro la relación de absorbancias 260/230 (permite determinar contaminación con sales, fenoles o carbohidratos), el promedio obtenido fue de 2.0 [intervalo esperado: 2.0 – 2.2], estos resultados indicaron una buena calidad del ADN para los análisis posteriores basados en ADN con alta pureza y sin contaminantes indispensable para la preparación de las librerías de secuenciación.

Figura 4-7 Electroforesis ADN genómico de aislados de *P. rettgeri.*

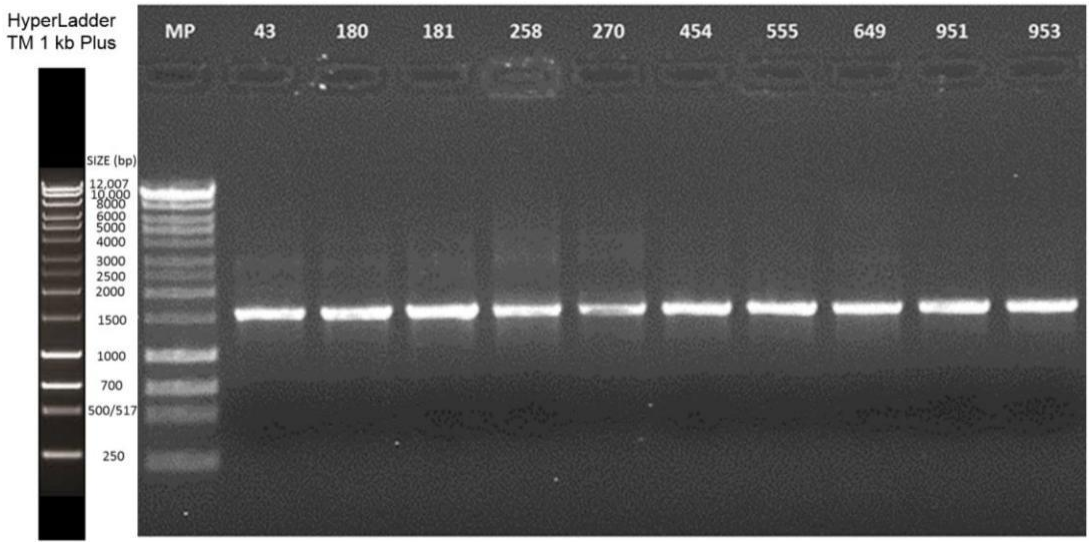


En la figura se observa el resultado de la extracción de ADN de los aislamientos de *P. rettgeri*: 1) GMR-RA180, 2) GMR-RA18,1 3) GMR-RA218, 4) GMR-RA278, 5) GMR-RA45,4 6) GMR-RA555, 7) GMR-RA649, 8) GMR-RA 951, 9) GMR-RA1048, 10)GMR-RA1152, 11) GMR-RA136.16, 12) GMR-RA222.16, 13) GMR-RA428.16, 14) GMR-RA438.16, 15) GMR-RA445.16

4.4 Identificación molecular

Se implementó la combinación de técnicas de identificación como la amplificación y secuenciación del gen 16s rRNA para confirmar el género y especie de los aislamientos de *P. rettgeri* del estudio. Para la amplificación podemos observar en la Figura 4-8, el corrido electroforético en los carril 2 al 11 bandas a 1500 pb correspondientes al gen de interés 16 rRNA para *Providencia rettgeri.* La alineación y evaluación de la secuenciación de 16s rRNA se realizó comparando con secuencias disponibles en la base de datos NCBI, utilizando el algoritmo BLASTn. Una identidad del 99% al 100% para los mejores hits obtenidos de los datos de secuenciación de 16S, permitieron confirmar que los aislamientos correspondían al género y especie: *Providencia rettgeri* (Anexo C-1).

Figura 4-8 PCR gen 16S rRNA en aislamientos de *P. rettgeri.*



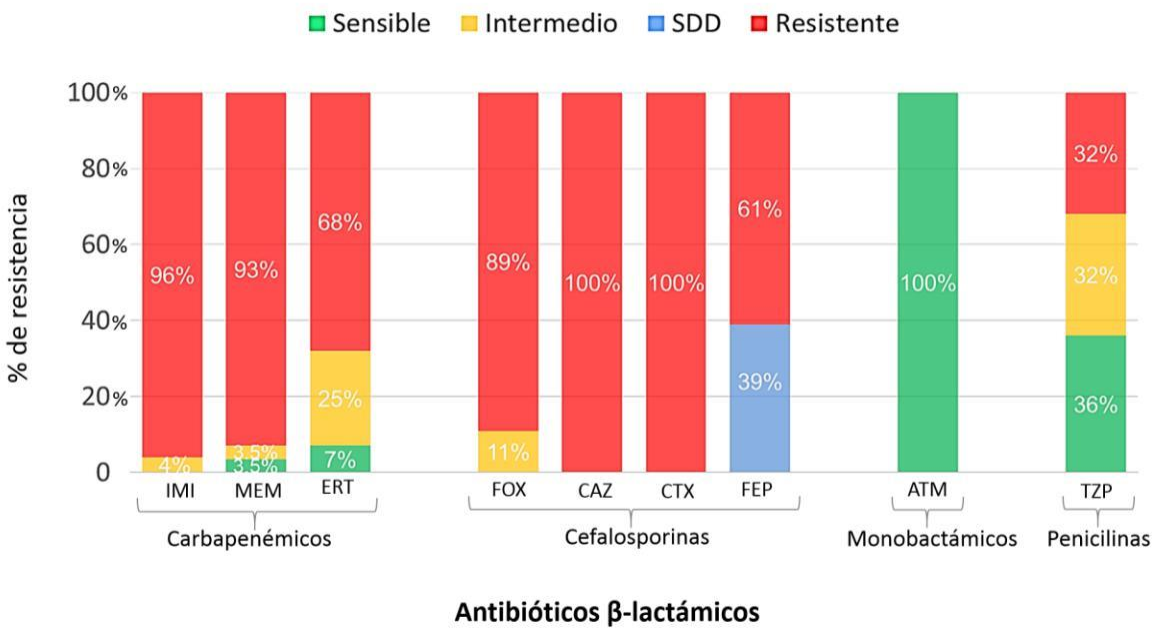
En la figura se observa el resultado de la amplificación del gen 16S rRNA en los aislamientos de *P. rettgeri* 1) Marcador de Peso Molecular HyperLadderTM 1 kb Plus 2) GMR-RA 43 3) GMR-RA 180 4) GMR-RA 181 5) GMR-RA 258 6) GMR-RA 270 7) GMR-RA 454 8) GMR-RA 555 9) GMR-RA 649 10) GMR-RA 951 11) GMR-RA 953.

A continuación se describe y analiza el perfil de susceptibilidad a antibióticos betalactámicos y posteriormente se analiza el perfil de susceptibilidad a antibióticos No betalactámicos en los genomas de *P. rettgeri* del estudio. La discriminación entre betalactámicos y no betalactámicos se realizó empleado los antibióticos que en clínica son principalmente usados para el tratamiento de infecciones por enterobacterias.

4.5 Perfil fenotípico de susceptibilidad a antibióticos betalactámicos

Los resultados de resistencia de los 28 aislamientos de *Providencia rettgeri* a las diferentes clases de antibióticos betalactámicos (carbapenémicos, cefalosporinas, monobactámicos y penicilinas) se representan en la Figura 4-9. Al aplicar los puntos de corte del CLSI, se observaron porcentajes elevados de resistencia principalmente en las categorías de carbapenémicos y cefalosporinas. Los aislamientos de *P. rettgeri* fueron clasificados como MDR (*multidrug-resistant*) por presentar resistencia a más de 3 clases de antimicrobianos.

Figura 4-9 Perfil fenotípico de resistencia a antibióticos betalactámicos.



Con respecto a los carbapenémicos los aislamientos presentaron niveles de resistencia elevados para los tres antibióticos evaluados, el imipinem fue el antibiótico con mayor tasa de resistencia 96% (n=27), seguido del meropenem con un porcentaje de resistencia del 93% (n=26), el carbapenémico más activo fue el ertapenem (7% sensibles), aun así el porcentaje de resistencia presentado para este antibiótico fue elevado 68% (n=19) incluyendo un porcentaje considerable de aislados con resistencia intermedia 25% (n=7).

En cuanto a los cefalosporinas, todos los aislados de *Providencia rettgeri* fueron resistentes a las cefalosporinas de tercera generación ceftazidime y cefotaxime [100% (n=28)]. Además presentaron una resistencia elevada a la cefalosporina de segunda generación cefoxitina 89% (n=25) incluyendo un 11% (n=3) de aislamientos con resistencia intermedia para este antibiótico. La resistencia a cefepima cefalosporina de cuarta generación fue notable, el 61% (n=17) de los aislados presentaron esta característica, y el 39% de los aislados se incluyeron dentro de la categoría SDD (sensible dependiente de la dosis), en donde su sensibilidad dependió del régimen de dosificación que se utilizó. Cabe destacar el elevado porcentaje de resistencia a cefalosporinas donde ningún aislamiento fue sensible para ningún antimicrobiano presente en esta categoría.

La piperacilina-tazobactam ureidopenicilina que se evaluó por el grupo de las penicilinas presentó una resistencia del 36% (n=10) y un porcentaje del 32% de los aislamientos presento una susceptibilidad intermedia. Cabe resaltar que la piperacilina-tazobactam fue uno de los antibióticos más activos frente a aislamientos de *P. rettgeri,* con una sensibilidad de los aislados en un 32%. Por otra parte, todos los aislamientos de *Providencia rettgeri* del estudio (100%; n=28) fueron susceptibles al monobactámico aztreonam.

En la Tabla 4-1, se presenta el perfil de susceptibilidad de datos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos por antimicrobiano y categoría. Se observa que al comparar los aislamientos de *P. rettgeri* en conjunto el 32% fueron resistentes a todos los antimicrobianos betalactámicos evaluados. Ningún aislamiento fue sensible a imipinem y solamente el 3,6% y el 7.2% de los aislamientos fueron sensibles a meropenem y ertapenem respectivamente. En cuanto a la resistencia por categoría se determinó que el 68% (n=19) de los aislamientos fueron resistentes en conjunto a los tres carbapenémicos evaluados, mientras que el 61% (n=17) fueron resistentes a todas las cefalosporinas ensayadas. Un único aislamiento de *Providencia rettgeri* presentó sensibilidad simultánea a dos carbapenémicos (meropenem y ertapenem) y a su vez sensibilidad a piperacilina-tazobactam.

Tabla 4-1 Perfil de susceptibilidad de aislamientos de *P. rettgeri* a antibióticos betalactámicos.

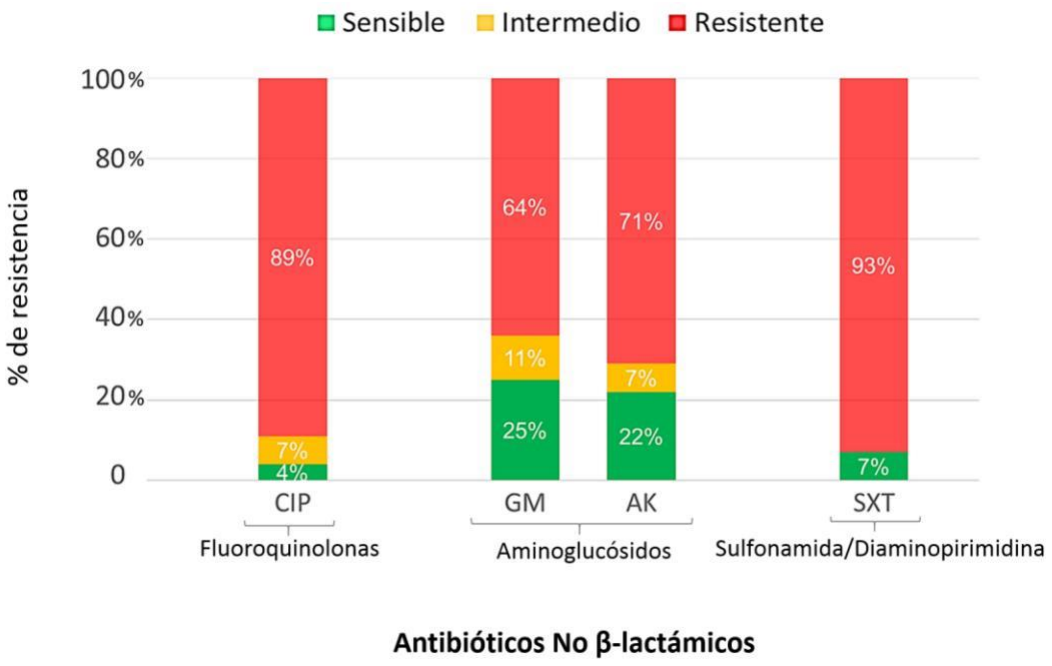
Aislamientos	Antibióticos β-lactámicos																	
	Kirby-Bauer – Zona de Interpretación (mm)																	
	Carbapenémicos						Cefalosporinas								Penicilinas		Monobactam	
	IMI		MEM		ERT		FOX		CAZ		CTX		FEP		TZP		ATM	
	mm	*Int*	*mm*	*Int*	*mm*	*Int*	*mm*	*Int*	*mm*	*Int*	*mm*	*Int*	*mm*	*Int*	*mm*	*Int*	*mm*	*Int*
GMR-RA 14	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	18	I	34	S
GMR-RA 15	6	R	6	R	12	R	6	R	6	R	8	R	17	R	19	I	30	S
GMR-RA 43	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R	10	R	19	SDD	19	I	31	S
GMR-RA 180	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	17	R	16	R	30	S
GMR-RA 181	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	15	R	17	R	28	S
GMR-RA 218	13	R	19	R	21	I	14	R	6	R	13	R	19	SDD	22	S	22	S
GMR-RA 257	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	18	R	22	S	29	S
GMR-RA 278	14	R	19	R	19	I	17	I	6	R	18	R	24	SDD	21	S	37	S
GMR-RA 437	6	R	6	R	11	R	12	R	6	R	6	R	6	R	6	R	36	S
GMR-RA 454	6	R	6	R	6	R	10	R	6	R	6	R	15	R	15	R	25	S
GMR-RA 555	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	17	R	17	R	30	S
GMR-RA 649	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	17	R	16	R	28	S
GMR-RA 767	12	R	19	R	19	I	15	I	6	R	18	R	22	SDD	22	S	35	S
GMR-RA 951	6	R	6	R	12	R	6	R	6	R	6	R	15	R	19	I	27	S
GMR-RA 953	6	R	6	R	12	R	6	R	6	R	6	R	13	R	15	R	27	S
GMR-RA 1048	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	11	R	18	R	20	I	30	S
GMR-RA 1080	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	18	R	19	I	30	S
GMR-RA 1151	6	R	6	R	6	R	13	R	17	R	13	R	20	SDD	13	R	26	S
GMR-RA 1152	12	R	14	R	17	R	6	R	6	R	6	R	14	R	18	I	29	S
GMR-RA 1153	10	R	16	R	20	I	11	R	6	R	6	R	21	SDD	21	S	28	S
GMR-RA 77.16	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	16	R	18	I	32	S
GMR-RA 136.16	14	R	16	R	20	I	16	I	6	R	17	R	23	SDD	22	S	39	S
GMR-RA 222.16	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	16	R	17	R	28	S
GMR-RA 385.16	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	13	R	20	SDD	21	S	37	S
GMR-RA 428.16	6	R	16	R	19	I	9	R	6	R	11	R	19	SDD	21	S	40	S
GMR-RA 438.16	21	I	26	S	25	S	6	R	6	R	6	R	6	R	26	S	36	S
GMR-RA 445.16	12	R	21	I	25	S	13	R	10	R	19	R	22	SDD	25	S	41	S
GMR-RA 466.16	12	R	17	R	19	I	13	R	6	R	15	R	20	SDD	19	I	36	S

Sensible (S), Intermedio (I), Resistente (R), Dosis dependiente (SDD). **Zona de interpretación:** Imipinem (IMI): [S] ≥23 [I] 20-22 [R] ≤19. Meropenem (MEM): [S] ≥23 [I] 20-22 [R] ≤19. Ertapenem (ERT): [S] ≥22 [I] 19-21 [R] ≤18. Cefoxitin (FOX): [S] ≥18 [I] 15-17 [R] ≤14. Ceftazidima (CAZ): [S] ≥21 [I] 18-20 [R] ≤17. Cefotaxima (CTX): [S] ≥26 [I] 23-25 [R] ≤22. Cefepima (FEP): [S] ≥25 [SDD] 19-24 [R] ≤18. Piperacilina-tazobactam (TZP): [S] ≥21 [SDD] 18-20 [R] ≤17. Aztreonam: (ATM): [S] ≥21 [I] 18-20 [R] ≤17.

4.6 Perfil fenotípico de susceptibilidad a antibióticos No betalactámicos

Los resultados de resistencia a antibióticos no betalactámicos como ciprofloxacina, gentamicina, amikacina y trimetoprima/sulfametoxazol se representan en la Figura 4-10, de acuerdo a los puntos de corte usados fueron los del CLSI. Se observaron porcentajes elevados de resistencia a todos los antibióticos evaluados. Los antibióticos con mayor porcentaje de resistencia fueron trimetoprima/sulfametoxazol con 93% (n=26) y ciprofloxacina con 89% (n=25). Los antibióticos más activos en esta categoría fueron los aminoglucósidos, la gentamicina presentó un número considerable de aislamientos sensibles 25% (n=7) y la amikacina de 22% (n=6), aun así la tasa de resistencia expresada para estos aminoglucósidos fue del 64% y 71% respectivamente.

Figura 4-10 Perfil fenotípico de resistencia a antibióticos No betalactámicos.



Ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GM), amikacina (AK) y trimetoprima/sulfametoxazol (SXT).

Tabla 4-2 Perfil de susceptibilidad de aislamientos de *P. rettgeri* a antibióticos No betalactámicos.

Aislamientos	Antibióticos no β-lactámicos							
	Kirby-Bauer – Zona de Interpretación (mm)							
	Fluoroquinolona		Aminoglucósidos				Trimetoprima	
	CIP		GM		AK		SXT	
	mm	*Int*	*mm*	*Int*	*mm*	*Int*	*mm*	*Int*
GMR-RA 14	6	R	23	S	16	I	6	R
GMR-RA 15	6	R	6	R	12	R	6	R
GMR-RA 43	6	R	8	R	14	R	6	R
GMR-RA 180	6	R	6	R	8	R	6	R
GMR-RA 181	6	R	6	R	6	R	6	R
GMR-RA 218	29	S	22	S	12	R	6	R
GMR-RA 257	6	R	13	I	10	R	6	R
GMR-RA 278	13	R	18	S	17	S	6	R
GMR-RA 437	16	I	18	S	14	R	6	R
GMR-RA 454	6	R	6	R	12	R	8	R
GMR-RA 555	6	R	6	R	15	I	6	R
GMR-RA 649	6	R	8	R	10	R	6	R
GMR-RA 767	13	R	15	S	18	S	6	R
GMR-RA 951	6	R	6	R	13	R	6	R
GMR-RA 953	6	R	6	R	11	R	6	R
GMR-RA 1048	6	R	8	R	13	R	6	R
GMR-RA 1080	6	R	8	R	14	R	6	R
GMR-RA 1151	10	R	9	R	12	R	6	R
GMR-RA 1152	6	R	8	R	13	R	6	R
GMR-RA 1153	16	I	9	R	6	R	6	R
GMR-RA 77.16	6	R	9	R	17	S	6	R
GMR-RA 136.16	11	R	6	R	13	R	6	R
GMR-RA 222.16	6	R	6	R	13	R	6	R
GMR-RA 385.16	8	R	11	R	18	S	6	R
GMR-RA 428.16	6	R	14	I	11	R	6	R
GMR-RA 438.16	12	R	18	S	22	S	24	S
GMR-RA 445.16	6	R	22	S	23	S	24	S
GMR-RA 466.16	6	R	13	I	10	R	S	R

Sensible (S), Intermedio (I), Resistente (R). **Zona de interpretación:** Ciprofloxacina (CIP): [S] ≥21 [I] 16-20 [R] ≤15. Gentamicina (GM): [S] ≥15 [I] 13-14 [R] ≤12. Amikacina (AK): [S] ≥17 [I] 15-16 [R] ≤14. Trimetoprima/sulfametoxazol (SXT): [S] ≥16 [I] 11-15 [R] ≤10.

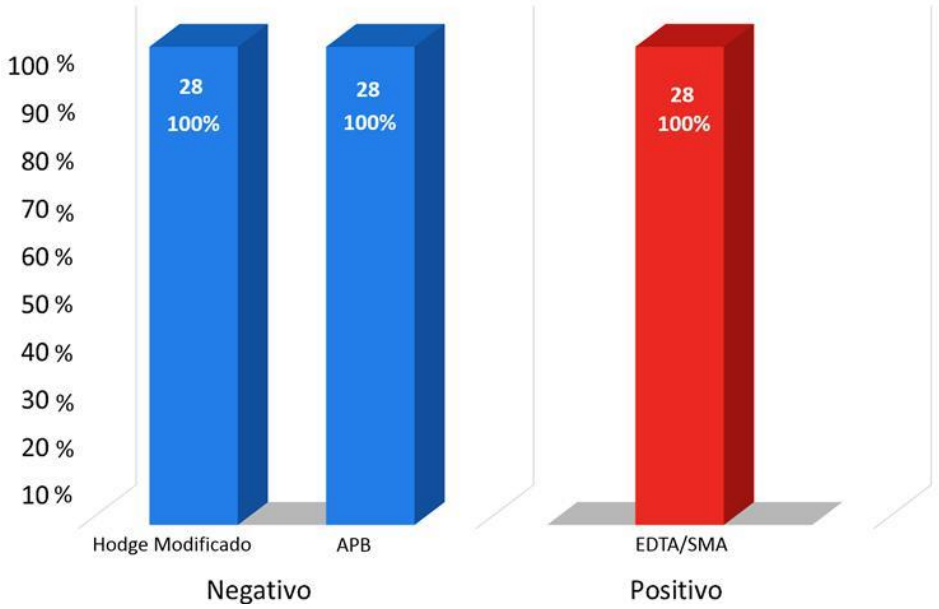
Los datos de resistencia a los antibióticos no carbapenémicos por antimicrobiano y categoría están recogidos en la tabla 4-2. El 50% (n=14) de los aislamientos fueron resistentes en conjunto a todos los antimicrobianos no betalactámicos evaluados. La sensibilidad simultánea a los dos aminoglucósidos evaluados (gentamicina y amikacina) se observó en el 11% de los aislados de *P. rettgeri.* Solamente un aislado (3,5%) fue sensible a la ciprofloxacina y un 7% (n=2) fueron sensibles a la

trimetoprima/sulfametoxazol. En cuanto a la resistencia por categoría se determinó que más de la mitad de los aislados (53%, n=15), fueron resistentes de manera paralela a los aminoglucósidos amikacina y gentamicina. Adicionalmente se presentó en una proporción baja (10.5%) resistencia intermedia para gentamicina y tan solo el 7% de los aislados fueron intermedios para amikacina y ciprofloxacina, ningún aislado de *P. rettgeri* fue intermedio para trimetoprima/sulfametoxazol.

4.7 Detección fenotípica de carbapenemasas

La detección de carbapenemasas por pruebas fenotípicas en los aislados de *P. rettgeri* se observa en la Figura 4-11. Se determinó mediante la prueba ácido etilendiaminotetraacético/ácido mercaptoacético (EDTA/SMA), la producción en el 100% de los aislamientos de enzimas tipo metalobetalactamasas. Así mismo, el test ácido fenil borónico (APB) fue negativo para el 100% de los aislados determinando la ausencia, según esta prueba de carbapenemasas clase A. La prueba de test de Hodge modificado (THM), fue también negativa para el 100% de los aislados de *P. rettgeri*.

Figura 4-11 Detección fenotípica de carbapenemasas.



4.8 Ensamblaje y anotación de los genomas de *P. rettgeri*

Los resultados promedios obtenidos para todos los genomas del ensamblaje con SPAdes v3.8.0 se muestran en la tabla 4-3; estos resultados muestran un contenido de G + C promedio para los aislamientos de *P. rettgeri* de 40.5%, siendo el valor esperado en reportes previos para esta especie (Galac & Lazzaro, 2012). Los tamaños obtenidos para los genomas de *P. rettgeri*, que comprendieron todos los contigs, oscilaron entre 4,5 y 5.0 Mb con un promedio estimado de 4,8 Mb para todos los aislamientos, resultado que corresponde a lo estimado para genomas de *P. rettgeri* [4.7 Mb, en estudios previos (Olaitan et al., 2015) (R. Alejandro Marquez-Ortiz et al., 2017)], la variación en tamaños entre genomas puede deberse a la presencia simultánea de algunos plásmidos con diferentes tamaños en los aislados, es importante señalar que los genomas del estudio fueron utilizados para los análisis sin discriminar cromosoma de plásmido. El número promedio de contigs para los 28 genomas correspondió a 121 contigs, a una profundidad promedio de 510x lecturas por base (oscilando entre 138x a 918x) esto aseguró un número mayor de lecturas únicas por secuencia de nucleótido, disminuyendo errores en la secuencia genómica. Los resultados mostraron 4459 secuencias codificantes (CDs) en los aislados de *P .rettgeri*, acordes a lo reportado en la literatura (Olaitan et al., 2015). En cuanto a los diferentes ARNs, se obtuvieron entre 68 y 75 ARNs de transferencia (tRNAs) en los aislados de *P. rettgeri* con un promedio de 69 tRNAs en todos los genomas; para los ARNs ribosomales se obtuvieron en promedio 7 rRNAs, resultado concordante con otros proyectos genómicos para *P. rettgeri* (Wang & Brucker, 2019) y en cuanto al ARN mensajero de transferencia (ARNtm) se obtuvo un único por genoma de estudio. Adicionalmente se identificaron alrededor de 4529 genes predichos para todos los genomas. Las características detalladas del ensamblaje y la anotación de cada genoma de *P. rettgeri* del estudio se pueden encontrar en el anexo (Anexo C-2).

Tabla 4-3 Resultados promedios del ensamblaje de genomas de *P. rettgeri* con SPAdes.

Valores ensamblajes evaluados	Número de contigs	Profundidad	Tamaño del genoma	N 50	% GC	CDS	tRNA	rRNA	Genes predichos
Valor mínimo	74	138x	4.560.478	187362	40.07	4173	68	4	4255
Promedio	121	510x	4.812.688	227595	40.55	4459	69	7	4529
Valor máximo	309	918x	5.055.909	395193	40.88	4739	75	10	4809

4.9 Identificación de elementos genómicos mediadores de resistencia

Para los 28 genomas analizados de *P. rettgeri*, se anotaron un total de 116 genes diferentes mediadores de resistencia, de acuerdo con los resultados de la anotación obtenida con el programa Prokka v1.13, enriquecido con bases de datos de resistencia para tal fin. Los diferentes genes encontrados (116 genes) están implicados en la resistencia de *P. rettgeri* tanto a antibióticos betalactámicos (carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y monobactámicos) como a antibióticos no betalactámicos (fluoroquinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas/diaminopirimidinas) y participan en cuatro diferentes mecanismos de resistencia reportados en la literatura, distribuidos de la siguiente manera: 38 (32.8%) son genes asociados con degradación y modificación del antibiótico; 48 (41.4%) con bombas de eflujo; identificando en *P. rettgeri* cuatro [MFS (superfamilia del facilitador mayor), SMR (familia de resistencia pequeña a multifármacos), ABC (familia de casete de unión a ATP) y RND (familia de resistencia a división por nodulación)] de las cinco superfamilias descritas para bombas en la actualidad; 29 (25%) genes asociados con cambio del sitio banco y tan solo se identificó 1 (0.8%) gen asociado con porinas. Además se identificaron varios reguladores transcripcionales de las bombas de eflujo pertenecientes a la familia MFS y RND.

En las tablas 4-4, 4-5, 4-6 y 4-7 se describen los genes diferentes mediadores de resistencia encontrados en *P. rettgeri*, y distribuidos por mecanismo de resistencia: degradación y modificación (Tabla 4-4), bombas de eflujo (Tabla 4-5), cambio del sitio blanco (Tabla 4-6), y porinas (Tabla 4-7).

Tabla 4-4 Genes de resistencia asociados a Degradación y Modificación del antibiótico en aislamientos de *P. rettgeri.*

Mecanismo de Resistencia	% *	Gen		Producto	Resistencia a
Genes de resistencia asociados a degradación y modificación de antibiótico en *P. rettgeri*	61	TEM-1	Clase A**	Betalactamasa de espectro extendido (BLEE)	Carbapenémicos, Cefalosporinas (cefamicinas), penicilinas
	4	PER-4			
	47	CTX-M-12			
	14	CTX-M-15			
	100	NDM-1	Clase B**	Metalobetalactamasa	
	14	VIM-2			
	7	VIM-24			
	11	CMY-2	Clase C**	Betalactamasa	
	100	SRT-2			
	7	OXA-1	Clase D**	Betalactamasa	
	18	OXA-10			
	82	*aadA1*		Nucleotidiltransferasa	Aminoglucósidos
	4	*aadA2*			
	4	*aadA6*			
	32	*aadA16*			
	11	*aac(2')-Ia*		Acetiltransferasa	
	58	*aac(3)-IIa*			
	7	*aac(3)-IIc*			
	68	*aac(6')-Ian*			
	7	*aac(6')-Ib-cr*			
	21	*ant(2'')-Ia*		Nucleotidililación	
	47	*aph(3')-Ia*		Fosfotransferasa	
	14	*aph(3'')-Ib*			
	18	*aph(3')-VI*			
	11	*aph(3')-Via*			
	14	*aph(6)-Id*			
	4	*catI*		Acetiltransferasa	Fenicoles
	25	*catII*			
	36	*catIII*			
	4	*catA1*			
	50	*catA2*			
	46	*EreA2*		Fosfotransferasa	Macrólidos, Lincosamidas y estreptogramina B
	4	*mph(G)*			
	4	*mph(E)*			
	11	*mph(A)*			
	18	*arr-2*		Ribosiltransferasa	Rifamicina
	7	*arr-3*			
	46	*FosA5*		Fosfomicina tiol transferasa	Fosfomicina

* Porcentaje de presencia en genomas de *P. rettgeri*. ** Clasificación molecular de Ambler para betalactamasas.

Tabla 4-5 Genes de resistencia asociados a Bombas de Eflujo en aislamientos de *P. rettgeri.*

	Familia	% *	Bomba	Gen	Producto	Resistencia a
Genes de resistencia asociados a Bombas de Eflujo en *P. rettgeri*	**MFS major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump**	100	EmrAB-TolC	*emrA*	Proteína de fusión de membrana	Fluoroquinolonas
		100		*emrB*	Translocasa	
		100		*emrR*	Regulador	
		100		*TolC*	Proteína de salida de la membrana externa	
		100	RosAB	*rosA*	Antiportador	Antibiótico peptídico
		96		*rosB*	Antiportador	
		100	emrD	*emrD*	Transportador	
		100	mdtH	*mdtH*	Transportador	Fluoroquinolonas
		14	cmlA5	*cmlA5*	Transportador	Fenicoles
		14	cmlA1	*cmlA1*	Transportador	Fenicoles
		39	tetA	*tetA*	Transportador	Tetraciclina
		96	tetD	*tetD*	Transportador	Tetraciclina
		7	tetY	*tetY*	Transportador	Tetraciclina
		64	tet(B)	*tet(B)*	Transportador	Tetraciclina
		28	tet(59)	*tet(59)*	Transportador	Tetraciclina
		36	mdtG	*mdtG*	Transportador	Fosfomicina
		53	tetR	*tetR*	Regulador	Tetraciclina
		50	PmrA	*PmrA*	Transportador	Fluoroquinolonas
	SMR small multidrug resistance (SMR) antibiotic efflux pump	11	qacH	*qacH*	Transportador	Fluoroquinolonas
		28	abeS	*abeS*	Transportador	Macrólidos Aminocumarina
		32	emrE	*emrE*	Transportador	
	ABC ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump	100	MacAB (genes implicados en la MacAB-TolC)	*macB*	Transportador	Macrólidos Antibiótico peptídico
		100		*PhoP*	Represor	
	RND resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	39	AcrAB-TolC	*AcrA*	Proteína de transporte	Cefalosporinas Penicilinas Tetraciclinas Glicilciclinas Fluoroquinolonas Rifamicinas Fenicoles
		39		*AcrB*	Hetero-trímero	
		96		*AcrR*	Represor	
		100		*TolC*	Proteína de salida de la membrana externa	

Genes de resistencia asociados a Bombas de Eflujo en *P. rettgeri*	**RND resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump**	39		*robA*	Regulador	
		100	MdtABC-TolC	*mdtA*	Proteína de fusión de membrana	Aminoglucósidos Aminocumarina Carbapenémicos
		100		*mdtB*	Complejo heteromultímero	
		100		*mdtC*	Complejo heteromultímero	
		100		*baeR*	Regulador	
		100		*baeS*	Sensor quinasa	
		100		*CpxA*	Sensor quinasa	
		39		*CpxR*	Regulador	
		100		*TolC*	Proteína de salida de la membrana externa	
		4	MexAB (genes implicados en la Bomba MexAB-OprM)	*mexA*	Proteína de fusión de membrana	Antibiótico peptídico Penicilinas Diaminopirimidinas Sulfonamidas Tetraciclinas Cefalosporinas Monobactámicos Carbapenémicos Aminocumarina Fenicoles Fluoroquinolonas Macrólidos Cefamicinas
		4		*mexB*	Exportador	
		53	MexGHI (genes implicados en la Bomba MexGHI-OpmD)	*mexG*	Proteína de membrana	Fluoroquinolonas Tetraciclinas
		96		*mexH*	Proteína de fusión de membrana	
		100		*mexI*	Transportador de membrana interna	
		57		*soxR*	Regulador	
		36	MdsAB (genes implicados en la Bomba MdsABC)	*mdsA*	Proteína de fusión de membrana	Carbapénemicos Cefalosporinas Monobactámicos Penicilinas Fenicoles Cefamicinas
		36		*mdsB*	Transportador de membrana interna	
		36		*golS*	Regulador	
		100		*PhoP*	Represor	
		7		*phoQ*	Proteína Sensor	
		53	Reguladores	*H-NS*	Represor	-
		100		*CRP*	Regulador	
		32		*leuO*	Activador	

* Porcentaje de presencia en genomas de *P. rettgeri*.

Tabla 4-6 Genes de resistencia asociados a Cambio del sitio blanco en aislamientos de *P. rettgeri.*

Mecanismo de Resistencia	% *	Gen	Producto	Resistencia a clase de Antibiótico
Genes de resistencia asociados a cambio del sitio blanco en P. *rettgeri*	32	*alaS*	Alanil-ARNt sintetasa	Aminocumarina
	100	*gyrB*	Subunidad B de ADN girasa	Fluoroquinolonas
	39	*gyrA*	Subunidad A de ADN girasa	
	39	*parC*	Subunidad de ADN topoisomerasa IV	
	75	*parE*	Subunidad de ADN topoisomerasa IV	
	43	*qnrD1*	Proteína de resistencia	
	39	*mfd*	Factor de acoplamiento	
	100	*GlpT*	Proteína de resistencia	Fosfomicina
	100	*murA*	Enolpiruvil transferasa	
	100	*LpxA*	UDP-N acetilglucosamina acetiltransferasa	Antibiótico peptídico
	57	*LpxC*	UDP-N acetilglucosamina3-0-deacetilasa	
	100	*rpoB*	Subunidad beta de la ARN polimerasa	
	96	*rpoC*	Subunidad beta de la ARN polimerasa	
	100	*arnA*	Fosfoetanolamina transferasa	
	4	*phoQ*	Proteína sensor	
	100	*PmrE*	Fosfoetanolamina transferasa	
	100	*PmrF*	Fosfoetanolamina transferasa	
	100	*folP*	Dihidropteroato sintasa	Sulfonamidas
	93	*Sul2*		
	78	*Sul1*		
	100	*rpsL*	Proteína ribosomal S12	Aminoglucósidos
	96	*tet34*	Enzima inactivadora	Tetraciclinas
	11	*Erm(42)*	Ribosomal RNA metiltransferasa	Macrólidos, Lincosamidas y estreptogramina B
	4	*msrE*	Protección ribosomal casete de unión a ATP	
	78%	*dfrA1*	Dihidrofolato reductasa	Diaminopirimidinas (Trimetropin)
	75%	*dfrA6*		
	7%	*dfrA19*		
	4	*dfrA12*		
	57	*dfrA17*		

* Porcentaje de presencia en genomas de *P. rettgeri*.

Tabla 4-7 Genes de resistencia asociados a porinas en aislamientos de *P. rettgeri.*

Mecanismo de Resistencia	% *	Gen	Producto	Resistencia a clase de Antibiótico
Gen de resistencia asociados a Porinas en *P. rettgeri*	72	*Omp36*	Porina bacteriana general con permeabilidad reducida a los betalactámicos	Carbapenémicos, Cefalosporinas (cefamicinas), monobactámicos penicilinas

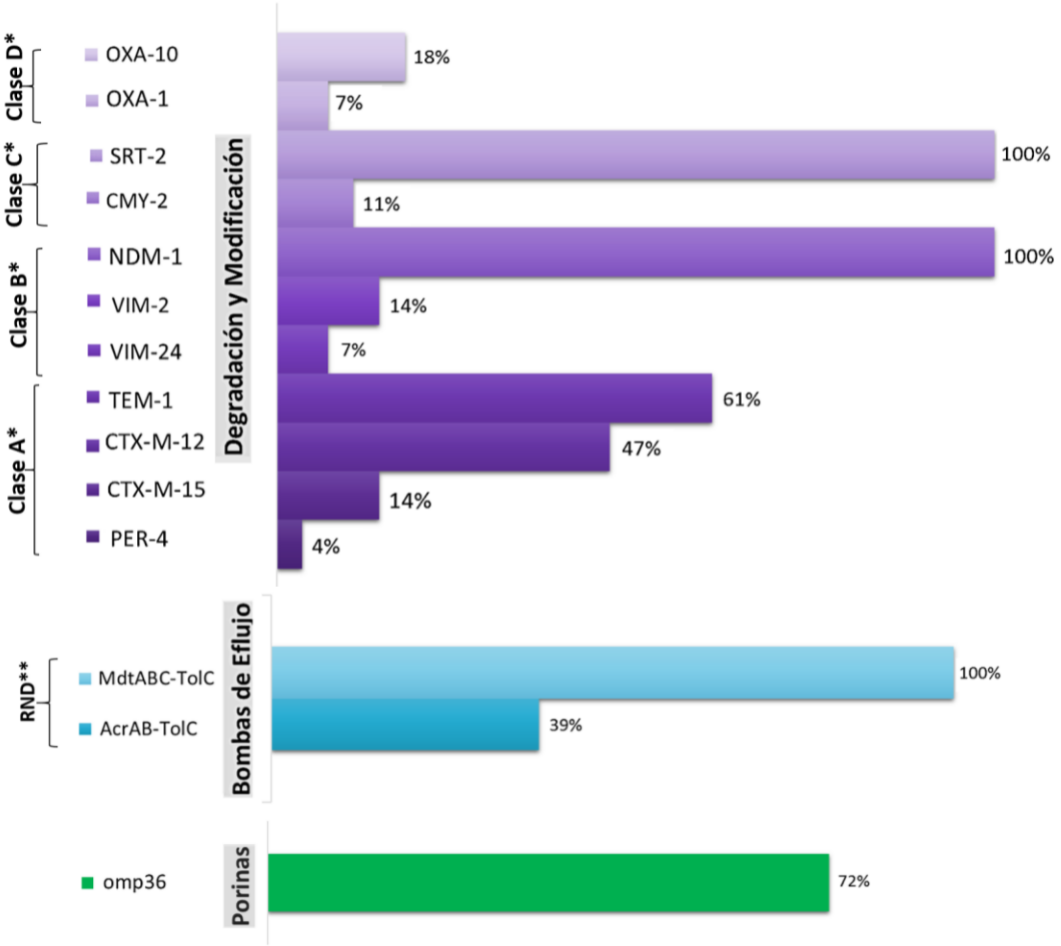
* Porcentaje de presencia en genomas de *P. rettgeri*.

A continuación, una vez identificados de manera general los genes implicados en la resistencia de los aislados, se describieron y analizaron los genes de resistencia implicados primero en la resistencia a antibióticos betalactámicos y posteriormente los genes de resistencia asociados con resistencia a antibióticos No betalactámicos en los genomas de *P. rettgeri* del estudio.

4.10 Elementos genómicos de resistencia a antibióticos betalactámicos

En la Figura 4-12 podemos observar los elementos genómicos asociados con resistencia a antibióticos betalactámicos (carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas, monobactámicos), distribuidos por mecanismo de resistencia y el porcentaje de presencia de cada gen en los aislamientos de *P. rettgeri* del estudio.

Figura 4-12 Elementos Genómicos asociados con resistencia a antibióticos betalactámicos en *P. rettgeri.*



Como se observa en la Figura 4-12, son tres mecanismos implicados en la resistencia a antibióticos betalactámicos: degradación y modificación del antibiótico, bombas de eflujo y porinas. Es importante destacar que los genes implicados en el mecanismo cambio del sitio blanco, no se vieron asociados con la resistencia a betalactámicos. En la categoría de degradación y modificación, se observa la presencia de genes en las 4 categorías de betalactamasas descritas por la clasificación molecular de Ambler (Bush & Jacoby, 2010), siendo los genes *bla*NDM-1 y *bla*SRT-2 los más predominantes, estando en el 100% de los aislamientos. En cuanto a la categoría A, betalactamasas de espectro extendido (BLEE), *bla*TEM-1 es la BLEE con mayor porcentaje de presencia 61% (n=17), seguido de la BLEE *bla*CTX-M-12 con un porcentaje de presencia del 47% (n=13), *bla*CTX-M-15 estuvo presente en tan solo 4 aislamiento (14%) y *bla*PER-4 en 1 (4%) de los 28

aislamientos de *P. rettgeri*. Hubo un importante porcentaje de coexistencias de BLEEs en los aislados de *P. rettgeri*, 13 aislamientos (46%) presentaron en conjunto *bla*CTX-M-12 y *bla*TEM-1, 2 aislamientos (7%) presentaron a su vez *bla*CTX-M-15 y *bla*TEM-1 y un aislamiento (4%) presentó una coexistencia de BLEEs de importancia clínica, mostrando en conjunto genes *bla*CTX-M-12, *bla*CTX-M-15 y *bla*TEM-1.

En la categoría B metalobetalactamasas, se corroboró que el 100% de los aislamientos contenían el gen *bla*NDM-1 y tan solo el 14% y 7% de los aislamientos exhibieron la presencia de *bla*VIM-2 y *bla*VIM-24 respectivamente. Las coexistencias observadas de metalobetalactamasas también son relevantes en el área hospitalaria; 4 aislamientos (14%) presentaron en conjunto *bla*NDM-1 y *bla*VIM-2 y 2 de los aislamientos (7%) de *P. rettgeri* presentaron en conjunto *bla*NDM-1 y *bla*VIM24. En la categoría C, se determinó la presencia en el 100% de los aislados del gen *bla*SRT-2 y tan solo 3 aislados (11%) presentaron el gen *bla*CMY-2. Por el lado de la categoría D, sus genes representantes (*bla*OXA), son los genes con menor porcentaje de presencia en aislados de *P. rettgeri*, solamente 5 aislamientos presentaron *bla*OXA-10 (18%) y tan solo 2 aislamientos *bla*OXA-1 (7%), además no se observó coexistencia de relevancia en esta categoría ni en la categoría C.

En la categoría de bombas de Eflujo, se observa la presencia de dos bombas implicadas en la resistencia a antibióticos betalactámicos: MdtABC-TolC y AcrAB-TolC. Los genes implicados en la bomba MdtABC-TolC que codifican un sistema de flujo de salida de fármacos pertenecientes a la familia RND, están presentes en el 100% de los aislados de *P. rettgeri*, mientras que los genes implicados en la bomba AcrAB-TolC también perteneciente a la familia RND se encuentra tan solo en el 39% de los aislamientos. Cabe destacar que los 11 aislamientos de *P. rettgeri* que contienen la bomba AcrAB-TolC también presentan de manera simultánea la bomba MdtABC-TolC, esto demuestra la presencia de dos bombas de eflujo que confieren resistencia a betalactámicos en el 39% de los aislamientos. En la categoría de porinas, solamente se pudo identificar la presencia de una única porina, la porina *omp36*, implicada en resistencia a antibióticos betalactámicos. Este gen (omp36) está presente en el 73% (n=20) de los aislamientos y está relacionado ampliamente con la salida de fármacos que contenga un anillo β-lactámico en su estructura molecular.

4.11 Elementos genómicos de resistencia a antibióticos No betalactámicos

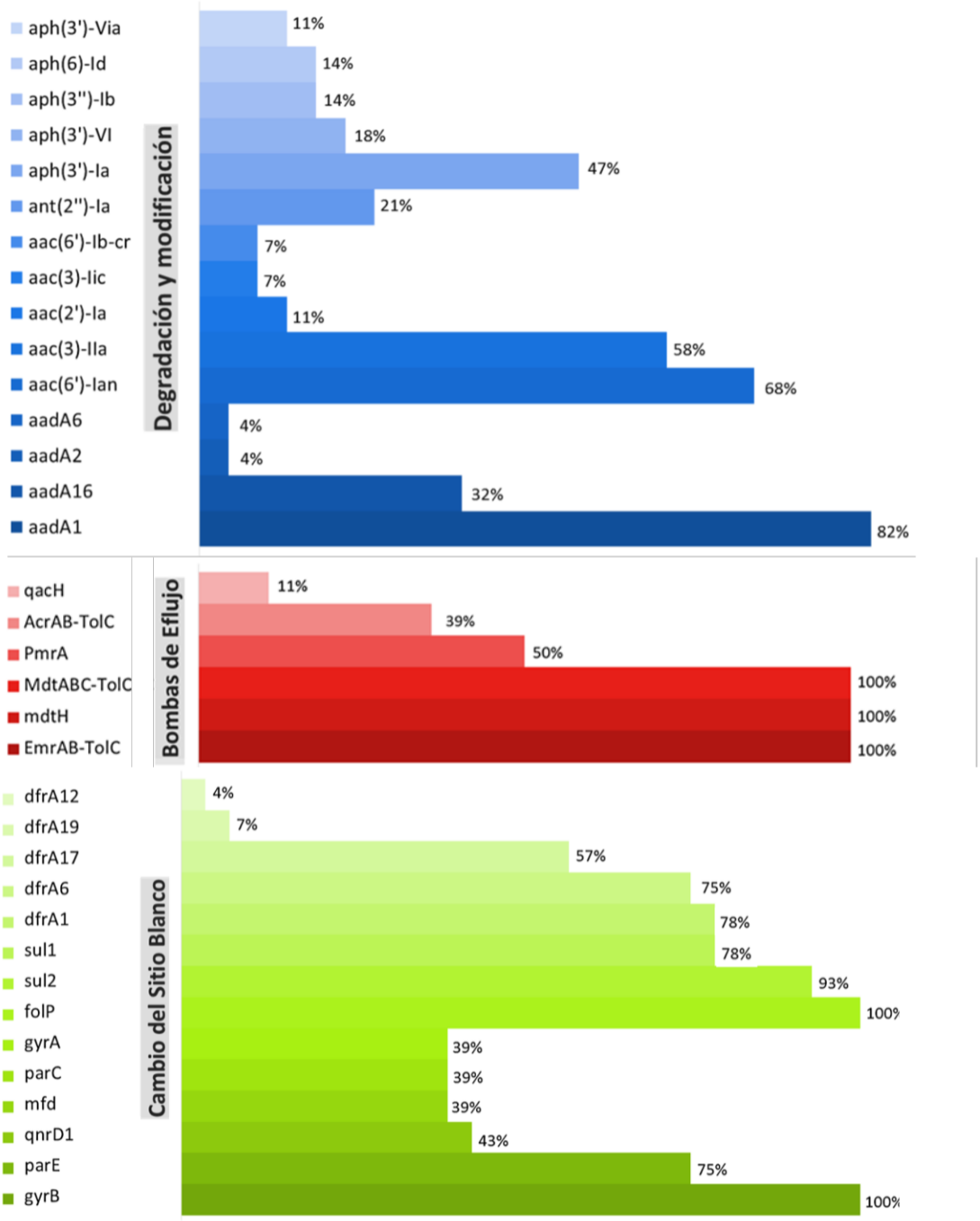


Figura 4-13 Elementos Genómicos asociados con resistencia a antibióticos No betalactámicos en *P. rettgeri.*

En la Figura 4-13 podemos observar los elementos genómicos asociados con resistencia a antibióticos no betalactámicos (fluoroquinolonas, aminoglucósidos y sulfonamidas/diaminopirimidinas), distribuidos por categoría de resistencia y el porcentaje de presencia de cada gen en los aislamientos de *P. rettgeri* del estudio.

Es importante mencionar que este resultado se obtuvo de la depuración de los genes encontrados para los diferentes mecanismos de resistencia en *P. rettgeri,* teniendo en cuenta únicamente los mecanismos asociados con resistencia a los siguientes antibióticos no betalactámicos: fluoroquinolonas, aminoglucósidos y sulfonamidas/ diaminopirimidinas. Estos antibióticos fueron elegidos, debido a que, en clínica son los antibióticos No betalactámicos principalmente evaluados para enterobacterias. Se observa en la Figura 4-13 que tres mecanismos diferentes están participando en la resistencia a estos antibióticos no betalactámicos: degradación y modificación, bombas de eflujo y cambio del sitio blanco. Los resultados mostraron que los genes implicados en el mecanismo porinas, no están asociados con la resistencia a no betalactámicos.

Para la categoría degradación y modificación se observó que 15 diferentes genes se encuentran asociados con resistencia a antibióticos no betalactámicos (Figura 4-13), específicamente estos genes están asociados con resistencia a aminoglucósidos. En la categoría nucleotidiltransferasa *aadA1* es el gen más representativo, está presente en el 82% (n=23) de los aislamientos de *P. rettgeri*, los demás genes de esta categoría se encuentran en menos de la mitad de los aislados, *aadA16* está presente en el 32% (n=9), *aadA2* y *aadA6* se encuentran en un único aislamiento, representando el 4% respectivamente. En la categoría acetiltransferasa los genes *aac(6')-Ian* y *aac(3)-IIa* representan los mayores porcentajes 68% (n=19) y 58% (n=16) respectivamente, los demás genes se encuentran en pocos aislados *aac(2')-Ia* en el 11% (n=3), *aac(3)-IIc* y *aac(6')-Ib-cr* en tan solo el 7% (n=2) de los aislamientos de *P. rettgeri*. Un único gen representante de la categoría nucleotidilación fue identificado*, ant(2'')-Ia*, estando presente en el 21% (n=6) de los aislados. En la categoría fosfotransferasas ninguno de los genes se encuentra en más del 50% de los aislados, aun así el gen *aph(3')-Ia* está en el 47% (n=13) de los mismos, el gen *aph(3')-VI* en el 18% (n=5), *aph(3'')-Ib* y *aph(6)-Id* en el 14% (n=4) y *aph(3')-Via* en el 11%. En todos los aislamientos de *P. rettgeri* se observa la presencia de 2 o más genes en un mismo aislado relacionado con genes pertenecientes a esta categoría, siendo la asociación *aph(3')-Ia, aac(6')-Ian, aadA1* y *aac(3)-IIa* la más identificada (39%).

En la Figura 4-13, se representa los genes asociados con resistencia a antibióticos no betalactámicos en la categoría bombas de Eflujo. Dos de las bombas aquí descritas MdtABC-TolC y AcrAB-TolC tienen la capacidad de expulsar un gran número de moléculas al exterior, sin discriminar si estas tienen o no un anillo betalactámico. Por tanto, así como estas bombas de la familia RND están implicadas en la resistencia a antibióticos betalactámicos también se encuentran asociadas con resistencia a antibióticos No betalactámicos; la bomba MdtABC-TolC está relacionada con resistencia a antibióticos aminoglucósidos y la bomba AcrAB-TolC con resistencia a fluoroquinolonas. Las demás bombas identificadas también tienen preferencia por las fluoroquinolonas, tres de ellas pertenecen a la familia MFS (superfamilia del facilitador mayor): EmrAB-TolC, mdtH, PmrA y una perteneciente a la familia SMR (familia de resistencia pequeña a multifármacos): qacH. Las bomba EmrAB-TolC y mdtH se encuentra en el 100% de los aislados de *P. rettgeri*, mientras que PmrA está en el 50% (n=14), la bomba qacH es la bomba con menor porcentaje (11%).

Los genes asociados con resistencia a antibióticos no betalactámicos en la categoría cambio del sitio blanco se presentan en la Figura 4-13. Los genes implicados dentro de esta categoría como *gyrB, parE, qnrD1, mfd, parC* y *gyrA* se encuentran asociados principalmente con resistencia a fluoroquinolonas, siendo el gen *gyrB* el más predominante estando en el 100% de los aislados, seguido del gen *parE* el cual está presente en 75% (n=21), el gen *qnrD1* está presente en el 43% de los aislados (n=12) de *P. rettgeri* y los genes *mfd, parC* y *gyrA* están tan solo en el 39% (n=11) respectivamente. Los genes *folP, sul2* y *sul1* están relacionados principalmente con resistencia a sulfonamidas estos tres genes se encuentran en porcentajes elevados, *folP* está en el 100% de los aislados, *sul2* en el 93% (n=26) y *sul1* en el 78% (n=22). Los genes *drfA* (Dihidrofolato reductasa) tiene principal afinidad por los antibióticos como las diaminopirimidinas, especialmente por la trimetoprima, la mayoría de esto genes se presentan también en altos porcentajes en aislados de *P. rettgeri*; *dfrA1* se encuentra en el 78% (n=22), *dfrA6* en el 75% (n=21) y *dfrA17* en el 57% (n=16), los otros dos genes encontrados en asilados de *P. rettgeri* de esta categoría se encuentran en porcentajes más bajos *dfrA19* en el 7% (n=2) y *dfrA12* en tan solo un aislamiento (4%).

4.12 Tipificación de Secuencia Multilocus Ribosomal (rMLST) de genomas de *P. rettgeri* del estudio

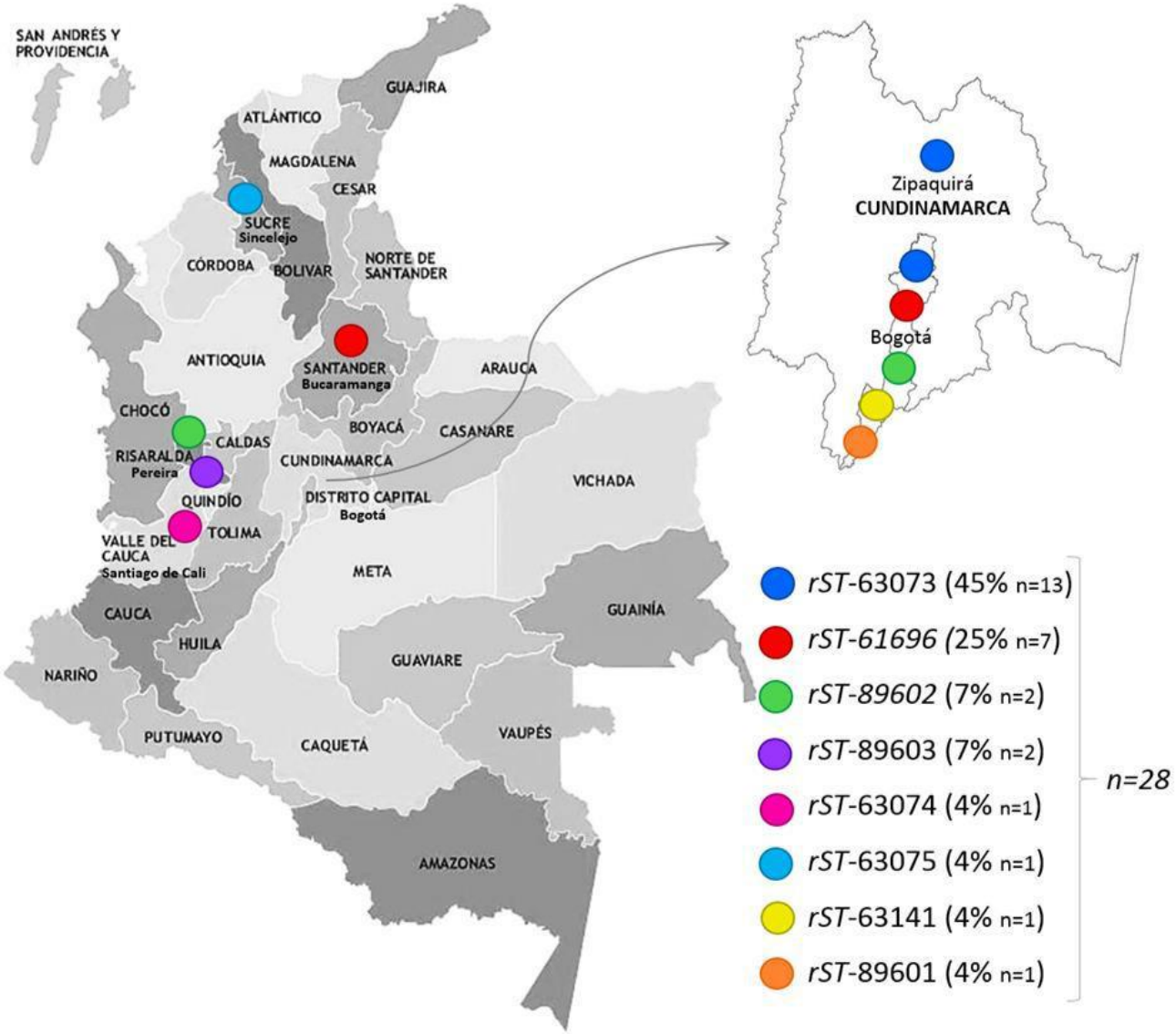
Con el fin de discriminar entre los diferentes aislados bacterianos de *P. rettgeri* en nuestro estudio y determinar distribuciones en función de sus diferencias de una forma rápida y confiable utilizamos los resultados de WGS para abordar el sistema de tipificación de secuencia multilocus ribosomal (rMLST). Esta metodología permite discriminar entre aislados de la misma especie, a partir de la indexación de los 53 genes que codifican las subunidades de la proteína ribosoma bacteriana (genes *rps, rpl, rpm*). El estudio permitió identificando en total 33 alelos nuevos para diferentes genes *rps, rpm* y *rpl* de *Providencia rettgeri*, estos nuevos alelos identificados fueron correspondientes a los genes *rpsB, rpsC, rpsD* (2 alelos), *rpsL* (2 alelos), *rpsN, rpsO* (2 alelos), *rpsS, rplA* (4 alelos), *rplB* (3 alelos), *rplF* (2 alelos), *rplI* (2 alelos), *rplK* (3 alelos), *rplO, rplS, rplX* (2 alelos), *rpmA, rpmB, rpmE* y *rpmL* (2 alelos), los cuales una vez identificados y enviados; fueron curados, designados y agregados por la base de datos rMLST. Una vez identificados los perfiles alélicos nuevos, el software rMLST asignó el secuencio-tipo rST, identificando 7 rSTs nuevos en *P. rettgeri*: rST-63073, rST-63074, rST-63075, rST-63141, rST-89601, rST-89602 y rST-89603. Estos nuevos rSTs fueron reportados por primera vez a la base de datos del rMLST por los grupos de investigación que hacen parte de este trabajo; y únicamente el rST-61696 se encontraba previamente reportado en la base de datos de rMLST.

Con estos resultados, se logró identificar por primera vez, 8 rSTs distintos de *P. rettgeri* circulando en Colombia; de los cuales 2 rSTs (rST-63073 y rST-61696) fueron los más frecuentemente encontrados, como se observa en la Figura 4-14. El rST-63073 fue el secuencio-tipo mayoritario, presente en el 45% de los aislamientos (n=13), seguido del rST-61696 presente en el 25% de los aislamientos (n=7). Los demás rSTs se presentaron en bajos porcentajes: rST-89602 y rST-89603 en el 7% de los aislados (n=2) respectivamente y los demás rSTs: rST-63074, rST-63075, rST-63141 y rST-89601 fueron identificados en aislamientos únicos, representado cada uno un porcentaje del 4% de presencia en los aislamientos de *P. rettgeri* del estudio.

Los aislados del rST mayoritario (rST-63073) pertenecían principalmente a Bogotá 93% (n=12) y tan solo el 7% (n=1) a Cundinamarca-Zipaquirá. Los aislamientos del segundo rST más frecuente (rST-61696) también correspondieron en su mayoría a la capital 86% (n=6) y únicamente el 14% (n=1) a Santander-Floridablanca. Así mismo, en Bogotá se

identificaron otros 3 diferentes rSTs: rST-63141 (n=1), rST-89601 (n=1) y uno compartido con Risaralda-Pereira el rST-89602 (n=2). De igual manera se determinaran rSTs únicos en tres departamentos diferentes de Colombia: rST-63074 (n=1) en el departamento del Valle en Cali, rST-63075 (n=1) en el departamento de Sucre en Sincelejo y el rST-89603 (n=1) en el departamento de Risaralda en Pereira (Figura 4-14).

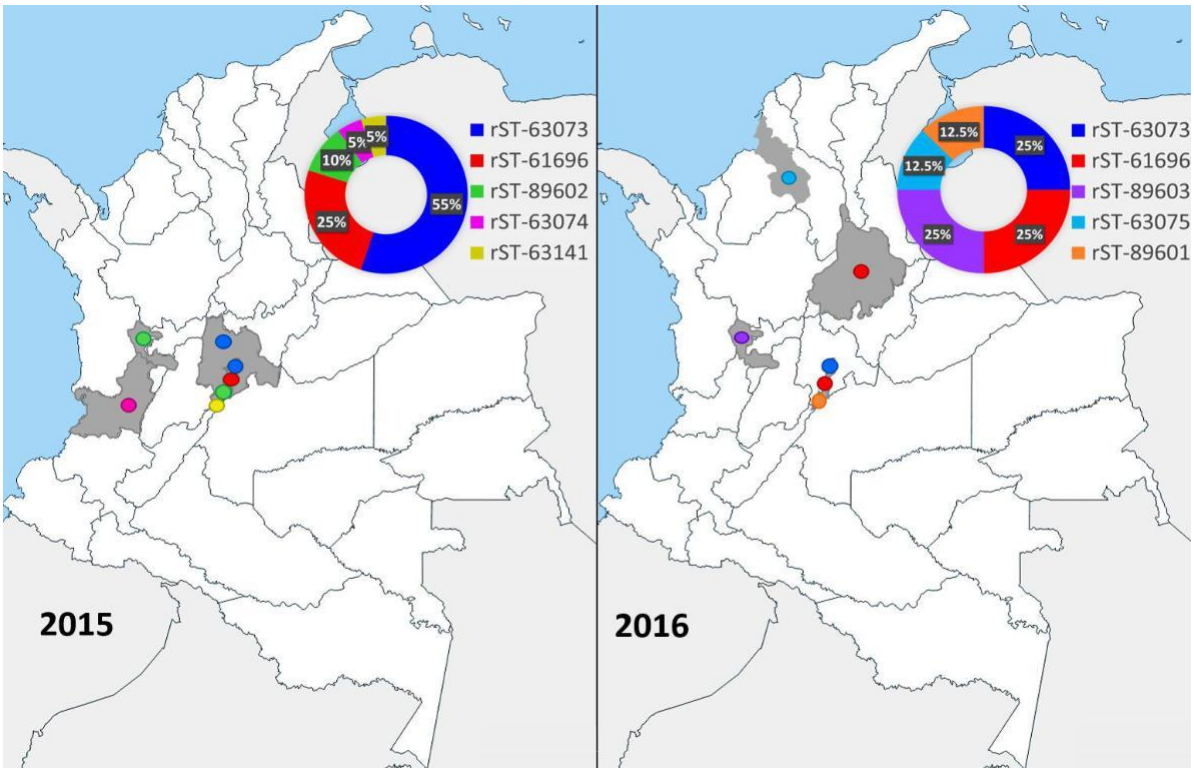
Figura 4-14 Distribución de aislamientos de *P. rettgeri* por rST y departamento.



En cuanto a la distribución de rSTs por periodo de recolección (2015 – 2016), de manera general podemos observar en la Figura 4-15 que los rSTs predominantes rST-63073 (color azul oscuro) y rST-61696 (color rojo) se encuentran presentes en ambos años de

recolección y en porcentajes mayores comparados con los demás rSTs. Sin embargo, en 2015, se observó un porcentaje de presencia del 55% para el rST mayoritario (rST-63073), disminuyendo a un porcentaje de presencia del 25% para el año 2016. No obstante el segundo rST mayoritario (rST-61696) mantiene un porcentaje de presencia constante (25%) en los dos periodos de recolección. Además, se puede observar en la Figura 4-15 que durante el año 2015 circulaba también en el país en bajos porcentajes los rSTs: rST-89602 (10%), rST-63074 (5%) y rST-63141 (5%), sin embargo en 2016 la presencia de estos rSTs no fue observada, evidenciándose para este año (2016) la circulación de otros diferentes rSTs: rST-89603, rST-63075 y rST-89601, también distribuidos en bajos porcentajes 25%, 12.5% y 12.5% respectivamente.

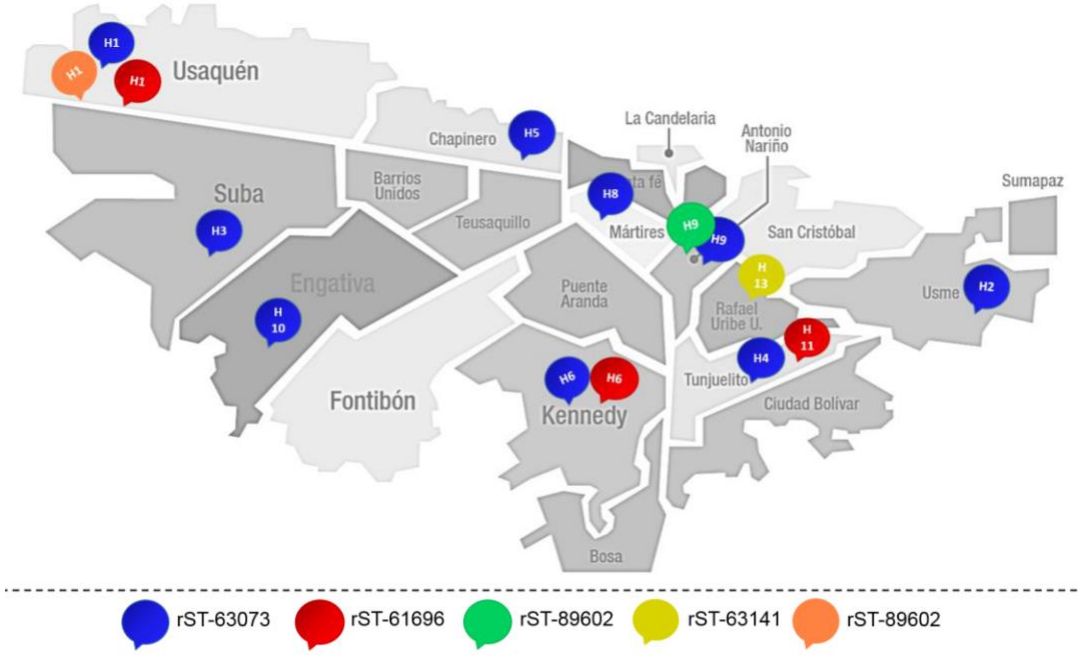
Figura 4-15 Distribución de *P. rettgeri* por rST y período de recolección.



Cabe resaltar que durante los años 2015-2016 se encontraban circulando 5 diferentes rSTs en la capital. Como se observa en la Figura 4-16, el rST mayoritario: rST-63073 (color azul) se encontraba distribuido tanto en hospitales del norte, sur, occidente y oriente de Bogotá, así mismo estos resultados muestran también cómo en tres diferentes instituciones hospitalarias se encontraban circulando distintos rSTs: en el hospital H1 ubicado al norte

de Bogotá se encontraban circulando 3 diferentes rSTs (rST-63073, rST-61696, rST-89602); en el hospital H6, ubicado al sur-occidente de Bogotá se encontraban circulando 2 rSTs distintos (rST-63073, rST-61696), al igual que en el hospital H9 donde también se encontraban circulando 2 diferentes rSTs (rST-63073, rST-89602).

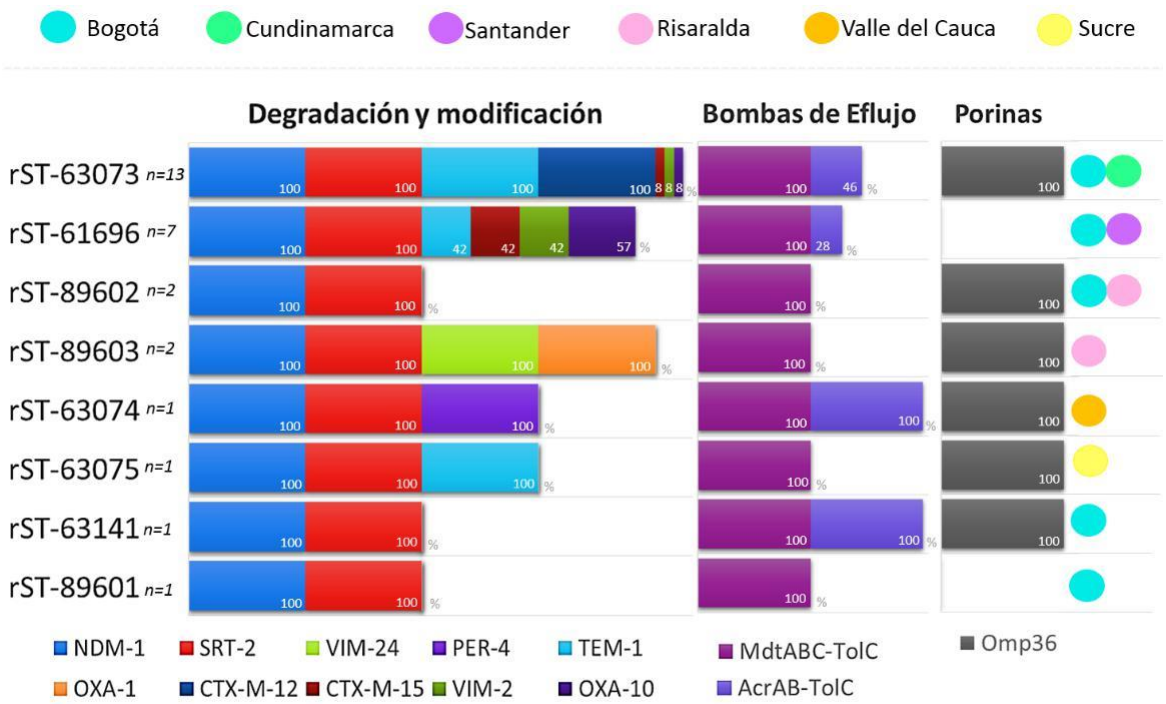
Figura 4-16 Distribución de *P. rettgeri* por rST en la capital.



4.13 Perfil genómico de resistencia a betalactámicos en *P. rettgeri* por rST y departamento

Con el propósito de determinar los elementos genómicos de resistencia a antibióticos betalactámicos asociados a cada rST circulante en el país durante el período 2015 – 2016, se realizó una agrupación por rST incluyendo: mecanismo de resistencia y porcentaje de presencia de cada gen por rST. Así mismo, se indicó el departamento de circulación de cada rST como metadato.

Figura 4-17 Perfil genómico de resistencia a betalactámicos por rST y departamento.



Antibióticos β-lactámicos

En cuanto a los elementos genómicos de resistencia a antibióticos betalactámicos por rST y departamento, de manera general podemos observar en la Figura 4-17 que el rST mayoritario rST-63073 contiene en el 100% de sus aislamientos 6 genes asociados con resistencia a antibióticos betalactámicos: 4 genes asociados a degradación y modificación (*bla*NDM-1, *bla*SRT-2, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M-12), 1 bomba de eflujo (MdtABC-TolC) y la porina omp36; además el 46% de los aislamientos de este rST contuvo la bomba omp36 y los genes de degradación *bla*CTX-M-15, *bla*VIM-2, *bla*OXA-10 se presentaron tan solo en el 8% de los aislados de este rST respectivamente. No obstante, este rST contiene en el 100% de sus aislamientos el mayor número de genes de resistencia asociados a betalactámicos, comparados con los demás rSTs. El otro rST mayoritario, el rST-61696 contuvo en el 100% de sus aislamientos 3 genes asociados con resistencia a antibióticos betalactámicos: 2 genes asociados a degradación y modificación (*bla*NDM-1, *bla*SRT-2) y la bomba de eflujo (MdtABC-TolC), así mismo el 57% de los aislados de este rST comprendieron el gen *bla*OXA-10; el 42% los genes de degradación: *bla*TEM-1, *bla*CTX-M-15, *bla*VIM-2; y tan solo el 28% la bomba AcrAB-TolC. Si comparamos los dos rSTs mayoritarios, podemos observar que el rST-63073 difiere del rST-61696 en que este último

no posee el gen asociado a la porina omp36, además tampoco posee entre su perfil genómico al gen asociado con degradación y modificación *bla*CTX-M-12. El rST que presentó el menor número de genes (n=3) asociados con resistencia a betalactámicos fue el rST-89601, este rST tan solo tiene la presencia en su perfil genómico de 2 genes asociados a degradación y modificación (*bla*NDM-1, *bla*SRT-2) y la bomba de eflujo MdtABC-TolC.

Es importante destacar que los genes *bla*NDM-1 y *bla*SRT-2 de la categoría degradación y modificación están presenten en el 100% de los rSTs del estudio. De manera detallada se puede observar que aunque el rST mayoritario (rST-63073) contiene el mayor número de genes (n=7) en la categoría degradación y modificación con respecto al segundo mayoritario rST-61696 (n=6), los genes *bla*CTX-M-15, *bla*VIM-2, y *bla*OXA-10 están presentes en un mayor número de aislados en el rST-61696 que en el rST mayoritario rST-63073; *bla*CTX-M-15 está en el 42% (n=3) de los aislados del rST-61696 al igual que *bla*VIM-2 y *bla*OXA-10 están en el 57% (n=4) de los aislados de este mismo rST, mientras que en el rST-63073 estos genes *bla*CTX-M-15, *bla*VIM-2, y *bla*OXA-10 están presentes tan solo en el 8% (n=1) de sus aislados.

Al observar la presencia de bombas de eflujo podemos determinar que el 100% de los rSTs aquí descritos contienen la bomba de eflujo MdtABC-TolC perteneciente a la familia RND y el 50% (n=4) de los rSTs (rST-63073, rST-61696, rST-63074, rST-63141) tuvieron presente la bomba AcrAB-TolC también perteneciente a la familia RND. En cuanto a las porinas, 5 rSTs (62%) contuvieron el gen *omp36* (rST-63073, rST-89602, rST-89603, rST-63074, rST-63075, rST-63141), gen que no fue identificado en el 25% de los rSTs restantes (rST-61696 y rST-89601).

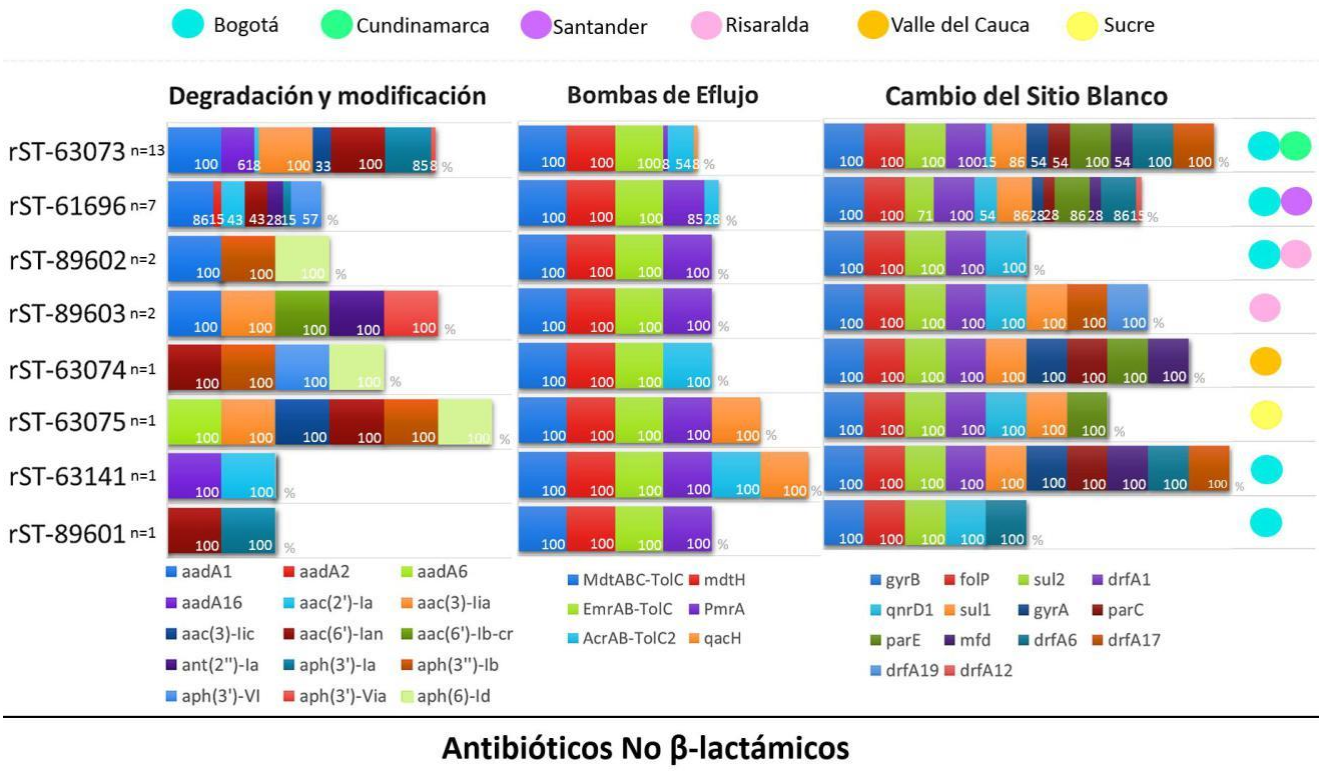
En cuanto a los departamentos podemos observar en la Figura 4-17, que los rSTs obtenidos en Risaralda (rST-89602 y rST-89603) y el rST obtenido en Sucre (rST-63075) fueron los únicos rSTs que no tuvieron presencia en su perfil genómico de la bomba de eflujo AcrAB-TolC. Además es importante destacar que el rST-89603 perteneciente a Risaralda fue el único rST que tuvo presencia del gen *bla*VIM-24 así como el rST del valle del Cauca rST-63074 fue el único rST que expresó el gen *bla*PER-4. La ausencia de porinas fue identificada únicamente en dos rSTs pertenecientes a la capital (rST-61696 y rST-89601). Cabe destacar que los rSTs con mayor cantidad de genes asociados con resistencia a antibióticos betalactámicos (rST-63073 y rST-61696) están asociados con el

71% de aislamientos del estudio (n=20) y están distribuidos en tres (50%) de los seis departamentos indicados en el presente trabajo (Bogotá, Cundinamarca y Santander).

4.14 Perfil genómico de resistencia a No betalactámicos en *P. rettgeri* por rST y departamento

Así mismo con el propósito de determinar los elementos genómicos de resistencia a antibióticos no betalactámicos asociados a cada rST circulante en el país durante el período 2015 – 2016, se realizó una agrupación por rST incluyendo: mecanismo de resistencia y porcentaje de presencia de cada gen por rST. Así mismo se indicó el departamento de circulación de cada rST como metadato.

Figura 4-18 Perfil genómico de resistencia a No betalactámicos por rST y departamento.



En cuanto a los elementos genómicos de resistencia a antibióticos No betalactámicos por rST y departamento, de manera general podemos observar en la Figura 4-18 que el rST mayoritario rST-63073 es el rST que contiene el mayor número de genes asociados con resistencia a No betalactámicos (n=26) por categoría [8 genes asociados a degradación y modificación (*aadA1, aadA16, aac(2')-Ia, aac(3)-IIa, aac(3)-IIc, aac(6')-Ian, aph(3')-Ia, aph(3')-Via*), 6 bombas de eflujo (MdtABC-TolC, mdtH, EmrAB-TolC, PmrA, AcrAB-TolC, qacH) y 12 genes asociados a cambio del sitio blanco (*gyrB, folP, sul2, dfrA1, qnrD1, sul1, gyrA, parC, parE, mfd, dfrA6, dfrA17*) en comparación con los demás rSTs. El otro rST mayoritario rST-61696, es el segundo rST con más presencia de genes asociados con resistencia a No betalactámicos (n=24), posee 7 genes asociados a degradación y modificación (*aadA1, aadA2, aac(2')-Ia, aac(6')-Ian, ant(2'')-Ia, aph(3')-Ia, aph(3')-VI*), 5 bombas de eflujo (MdtABC-TolC, mdtH, EmrAB-TolC, PmrA, AcrAB-TolC) y 12 genes asociados a cambio del sitio blanco (*gyrB, folP, sul2, dfrA1, qnrD1, sul1, gyrA, parC, parE, mfd, dfrA6, dfrA12*). Si comparamos los dos rSTs mayoritarios (rST-63073 y rST-61696) podemos observar que el rST-61696 difiere del rST-63073 porque no posee la bomba qacH, aunque poseen la misma cantidad de genes asociados a cambio del sitio blanco (n=12), el rST-63073 contiene a *dfrA12* a diferencia que en el rST-61696 el cual posee a *dfrA17* y su contenido asociado a genes asociados a degradación y modificación muestra que estos rSTs mayoritarios solo comparten 4 de los genes aquí descritos (*aadA1, aac(2')-Ia, aac(6')-Ian, aph(3')-Ia*). El rST con el menor número de genes (n=11) asociados con resistencia a antibióticos No betalactámicos fue el rST-89601, este rST tan solo tiene la presencia en su perfil genómico de 2 genes asociados a degradación y modificación (*aph(3'')-Ib , aph(3')-Ia),* 4 bombas de eflujo *(MdtABC-TolC, mdtH, EmrAB-TolC, PmrA*) y 5 genes asociados a cambio del sitio blanco (*gyrB, folP, Sul2, qnrD1, dfrA6*).

Al observar la presencia de bombas por rST podemos observar que el 100% (n=8) de los rSTs descritos en este estudio poseen tres clases bombas de eflujo: 2 bombas asociadas a la familia MFS (EmrAB-TolC, mdtH) y 1 bomba perteneciente a la familia RND (MdtABC-TolC). El rST mayoritario rST-63073 junto al rST-63141 son los únicos rSTs que poseen en su perfil genómico las 6 bombas descritas en el estudio (MdtABC-TolC, mdtH, EmrAB-TolC, PmrA, AcrAB-TolC, qacH). La bomba con menor proporción de presencia (37.5%) por rST fue la bomba de la familia SMR (qacH) estando únicamente presente en los rSTs (rST-63073, rST-63075, rST-63141) y la bomba AcrAB-TolC perteneciente a la familia RND estuvo presente en el 50% de los rSTs (rST-63073, rST-61696, rST-63074, rST-63141).

En cuanto a los departamentos de origen de estos aislamientos podemos observar en la Figura 4-18, que el rST obtenido en el departamento de Sucre el rST-63075 es el único rST con la presencia del gen *aadA6* perteneciente a la categoría degradación y modificación. El rST-89603 perteneciente al departamento de Risaralda presentó en su perfil genómico la presencia de los genes *aac(6')-Ib-cr* (degradación y modificación) y del gen *dfrA19* (cambio del sitio blanco) no descritos en ningún otro rST. Así mismo, el rST perteneciente a Bogotá el rST-61696 fue el único rST en poseer los genes *aadA2* y *dfrA12* coexistencia vista en otras enterobacterias (Padungtod, 2011). Es importante resaltar que los rSTs con mayor cantidad de genes asociados con resistencia a antibióticos No betalactámicos (rST-63073 y rST-61696) están distribuidos en tres (50%) de los seis departamentos indicados en el presente trabajo (Bogotá, Cundinamarca y Santander) y en la mayoría de los aislamientos de *P. rettgeri* del estudio (n=20).

4.15 Análisis genómico comparativo entre genomas de *P. rettgeri* del estudio

Con el propósito de realizar un análisis genómico comparativo, entre los 28 genomas de *P. rettgeri* del estudio, se realizó el cálculo del pangenoma y se infirió un árbol filogenético a partir de los genes central y accesorio producido por Roary.

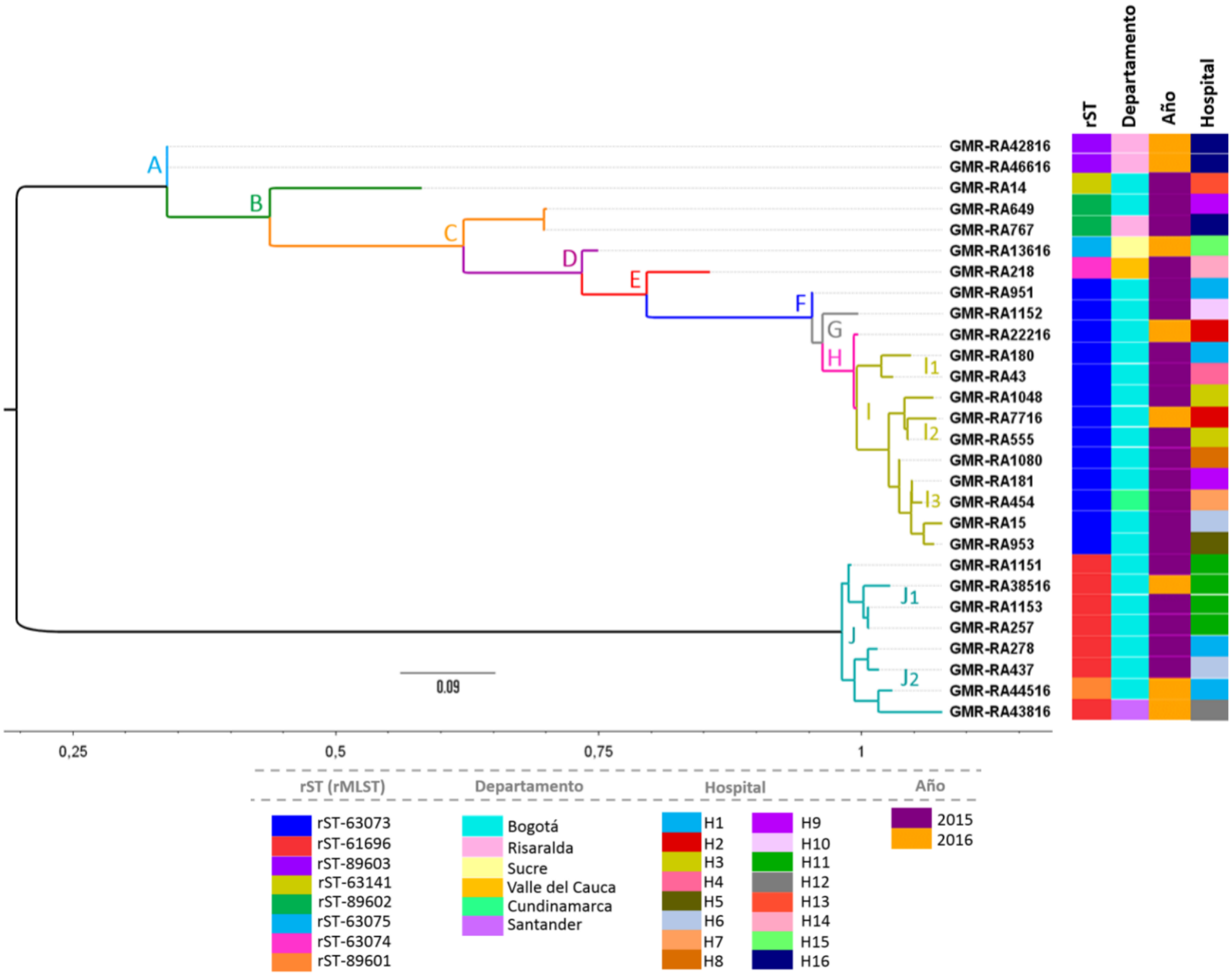
4.15.1 Pan-genoma y Análisis filogenético

Con los genomas de *P. rettgeri* secuenciados, ensamblados y anotados, se generó el pan-genoma de los 28 aislamientos de *P. rettgeri* mediante el programa Roary, esto con el fin de agrupar, en el conjunto de los 28 genomas, los genes que codificaban secuencias de proteínas completas y determinar el conjunto de datos del: genoma del núcleo (core genes); genoma accesorio (accessory genes); y genoma único (unique genes). Los genes del core se encontraron en un porcentaje 99% en los genomas estudiados, los genes accesorio se encontraron en un 15-95% mientras que los genes únicos estaban presentes

en menos del 15% de los genomas. De 12.398 proteínas ortólogas, el núcleo pan-genoma o genoma central de *P. rettgeri* comprendió 1.258 genes (en promedio 10.1% de cada genoma) y los 11.140 genes no centrales estaban comprendidos por 6.264 genes accesorio (50,5%) y 4.876 genes únicos (39,3%).

Así mismo, se construyó un árbol filogenético a partir de la información de presencia / ausencia de los genes central y accesorio producido por Roary para determinar las relaciones filogenéticas entre los aislamientos y realizar una tipificación basada en el pan-genoma lo que abarcaría una tipificación basada en la totalidad de los genes. En la Figura 4-19, se muestra el árbol filogenético generado a partir del pangenoma con Roary y en cuadros de colores una serie de metadatos que incluyen información sobre los aislamientos de *P. rettgeri* [rST asignado, año de recolección, departamento y hospital de procedencia del aislamiento] con el propósito de observar en conjunto tanto las variantes genómicas como socio-demográficas de los aislamientos. Podemos apreciar en el árbol filogenético obtenido la presencia de diez importantes clados (A-J) donde los diferentes tipos de rST se agruparon de la siguiente manera: el rST mayoritario (rST-63073) [representado en la columna rST por bloques azules oscuros] se dividió en 4 clados diferentes (clado F, G, H, I) y a su vez el clado I se subdividió en 3 subclados (I1, I2, I3), el segundo rST mayoritario el rST-61696 [representado en la columna rST por bloques rojos] fue asociado al clado J, incluyendo dentro de este clado también al rST-89602, así mismo el clado J se subdividió también en 2 subclados (J1 y J2) y los demás fueron asignados a clados de manera equivalente a su rST: rST-89603 (clado A), rST-63141(clado B), rST-89602 (clado C), rST-63075 (clado D) y rST-63074 (clado E).

Figura 4-19 Árbol filogenético genomas colombianos de *P. rettgeri.*



Es importante señalar que el árbol filogenético y por tanto la tipificación basada en el pan-genoma generó como resultado la división del rST mayoritario rST-63073 en 4 clados específicos: F, G, H, I así mismo los resultados del metadato destacan la distribución de esta variedad de clados principalmente en la ciudad de Bogotá. Dentro del rST-63073 en la Figura 4-19 observamos que tanto en el hospital (H1) como en el hospital (H2) se encontraban circulando varios aislamientos de *P. rettgeri* pertenecientes a clados diferentes: en el hospital H1 circulaba durante el año 2015 dos aislamientos de *P. rettgeri* asignados a los clados I (GMR-RA180) y F (GMR-RA951) y durante el año 2016 en el hospital H2, también se manifiesta la circulación de dos aislamientos de *P. rettgeri* pertenecientes a clados diferentes: I (GMR-RA7716) y H (GMR-RA22216) (Figura 4-19), estos resultados y el análisis de su distribución en el árbol sugiere que los cuatro aislamientos que circulaban, dos en el hospital (H1) y dos en el hospital (H2), son genéticamente distintos pero están muy relacionados, dado que en el árbol reflejan un origen común. Asimismo durante el año 2015 en el hospital H3, también se encontraban circulaban 2 aislamientos de *P. rettgeri* pero ambos pertenecientes al mismo clado I (Figura 4-19), al analizar el árbol podemos observar que además se encontraron ubicados en el mismo sub-clado (I2) y separados por una mínima distancia esto indicaría que estos aislados (GMR-RA555 y GMR-RA1048) estaban estrechamente relacionados. Es importante destacar que los 4 diferentes clados observados en el rST mayoritario (rST-63073) se encuentran distribuidos en toda la capital en 9 hospitales diferentes ubicados tanto al norte, sur, occidente y oriente de la ciudad y que el rST-63073 fue observado también en un aislado de 2015 de *P. rettgeri* en Cundinamarca-Zipaquirá, aislado perteneciente al clado I subclado I3 (GMR-RA454) el cual estaba estrechamente relacionado con el aislado GMR-RA181 encontrado en el hospital (H9) ubicado al sur de Bogotá.

El segundo rST mayoritario (rST-61696) fue relacionado con el clado J. El árbol filogenético y la tipificación basada en el pangenoma evidenció la relación clonal existente entre los aislados del estudio GMR-RA257 y GMR-RA1153 (Figura 4-19) ambos aislamientos pertenecían al mismo hospital (H11) y fueron recolectados durante el año 2015 en dos periodos de tiempo diferente marzo y diciembre respectivamente, estos resultados podrían indicar la posibilidad de que el hospital (H11) estuviera cursando con un brote por IACS para el año 2015 (entendiendo como brote por IACS la aparición de un nuevo caso por un microorganismo o perfil de resistencia no expresado comúnmente en un servicio o un

hospital). Así mismo, podemos ver que GMR-RA257 y GMR-RA1153 se encuentran en el árbol cercanamente a los aislados GMR-RA1151 y GMR-RA38516 (Figura 4-19), estos aislados también pertenecían al hospital (H11), hacían parte del mismo rST (rST-61696) y correspondían al mismo sub-clado (J1), estos resultados y el análisis del árbol indicarían que los aislados de *P. rettgeri* circulantes en el hospital H11 durante el periodo 2015 – 2016 estaban estrechamente relacionadas y reflejaban un origen común.

Al observar los resultados del árbol junto al metadato y al enfocarnos en aquellos hospitales donde se observa la aparición de varios aislamientos de *P. rettgeri* podemos determinar relaciones filogenéticas importantes. El hospital (H1) perteneciente a Bogotá realizó él envió de 4 aislamientos de *P. rettgeri*; tres pertenecientes al año 2015: GMR-RA951, GMR-RA180, GMR-RA278 y uno al año 2016: GMR-RA44516, sin embargo cuando realizamos el análisis comparativo podemos apreciar que los aislamientos son genómicamente distintos; al aplicar la tipificación a partir del rMLST podemos determinar la circulación de tres diferentes rSTs en el mismo hospital (H1), rST-63073 para los genomas GMR-RA951 y GMR-RA180, rST-61696 para el genoma GMR-RA278 y el rST-89601 para el genoma GMR-RA44516. Al aplicar la tipificación mediante el pan-genoma podemos observar una distribución aún más específica en el hospital observando la circulación de 3 diferentes clados: F, I y J y a su vez aislados ubicados dentro de diversos subclados (I1 y J2), con esta metodología además se logra discriminar que los genomas GMR-RA951 y GMR-RA180 ubicados dentro del mismo rST (rST-63073) son diversos también, ya que, se identificaron en clados diferentes (clado F y I) dentro del árbol. Un resultado interesante muestra que aunque los 4 aislamientos enviados por el hospital (H1) son *P. rettgeri* y provienen de un ancestro en común (Figura 4-19), los genomas GMR-RA951 y GMR-RA180 no se relacionan con los genomas GMR-RA278 y GMR-RA44516, este resultado se aprecia por las distancias tan marcadas dentro del árbol.

Como se mencionó anteriormente relaciones importantes fueron observadas con respecto al número de aislamientos enviados por hospital. El hospital (H16) perteneciente a Risaralda-Pereira realizó él envió de 3 aislamientos de *P. rettgeri*. En este caso los resultados de tipificación por rMLST se correlacionaron con los resultados de tipificación a partir del pangenoma, rMLST mostró la circulación de 2 diferentes rSTs en el hospital (H16): el rST-89603 asignado a los aislados GMR-RA42816, GMR-RA46616 y el rST-89602 asignado al aislado GMR-RA767 y el pangenoma identificó también la circulación de dos clados en el hospital donde el rST-89603 se relacionó con el clado A y el rST-89602

se relacionó con el clado C (Figura 4-19). Sin embargo, cuando detallamos el árbol podemos observar que dentro del clado C junto al aislado GMR-RA767 se encuentra el aislado GMR-RA649, la ubicación de ambos aislados en el árbol y las distancias observadas dentro del mismo muestra aislamientos genéticamente indistinguibles, no obstante el aislamiento GMR-RA649 es obtenido en Bogotá, en el hospital (H9), en el año 2015, en el mes de agosto y a partir de una fuente de orina y el GMR-RA767 es obtenido en Risaralda-Pereira, en el hospital (H15), también el año 2015 pero en el mes de septiembre y a partir de una fuente de hueso, estos resultados sugieren que los aislados podrían ser clonales (entendiendo por clonalidad aislamientos bacterianos de diferentes fuentes en diferentes ubicaciones y en diferentes momentos, pero que siguen mostrando rasgos genotípicos idénticos) (Belkum et al., 2007). Estos resultados evidencian un poder discriminatorio mayor a partir del conjunto de genes completos (pangenoma) y la falta de resolución cuando se basa la tipificación en un grupo específico de genes (rMLST).

4.16 Análisis genómico comparativo con genomas de referencia de *P. rettgeri*

Con el propósito de realizar un análisis genómico comparativo, los 28 genomas de *P. rettgeri* del estudio, se compararon con 16 genomas de *Providencia rettgeri* disponibles en el GenBank: 14 genomas de referencia: (RB151, H1736, CCBH11880, FDAARGOS_330, MR4, 729-12, UBA5024, ARBA024, TUM9994, Dmel1, DSM1131, PR1, Pret_2032, PR002) y 2 cepas de ~~re~~colección: (NCTC11801, NCTC74801).

4.16.1 Tipificación de Secuencia Multilocus Ribosomal (rMLST) de genomas de referencia de *P. rettgeri*

Para comparar los rSTs colombianos de *P. rettgeri* obtenidos en el estudio (véase sección 3-12) con rSTs de aislamientos de *P. rettgeri* del mundo, se realizó también la tipificación mediante el esquema rMLST para 16 genomas de *P. rettgeri* reportados en la base de datos del GenBank (véase sección 2-15). Como resultado se obtuvo que 8 de los 16

genomas de referencia de *P. rettgeri* se asignaron a siete tipos diferentes de rSTs, distribuidos de la siguiente manera: rST-61696, correspondiente a los genomas de referencia RB151 y FDAARGOS_330, rST-37423 a CCBH11880, rST-37424 a H1736, rST-37410 a DSM1131, rST-37417 a Dmel1, rST-63070 a PR002, y rST-63059 a PR1. Los genomas de referencia MR4, 729-12, UBA5024, AR_0082, TUM9994 y Pret_2032 y las cepas de colección NCTC11801 y NCTC7476 presentaron variaciones en diferentes loci que no estaban presentes en la base de datos del rMLST, por consiguiente, no se asignaron a perfiles alélicos específicos y por tanto a ningún rST.

4.16.2 Análisis filogenético de genomas de *P. rettgeri* del mundo

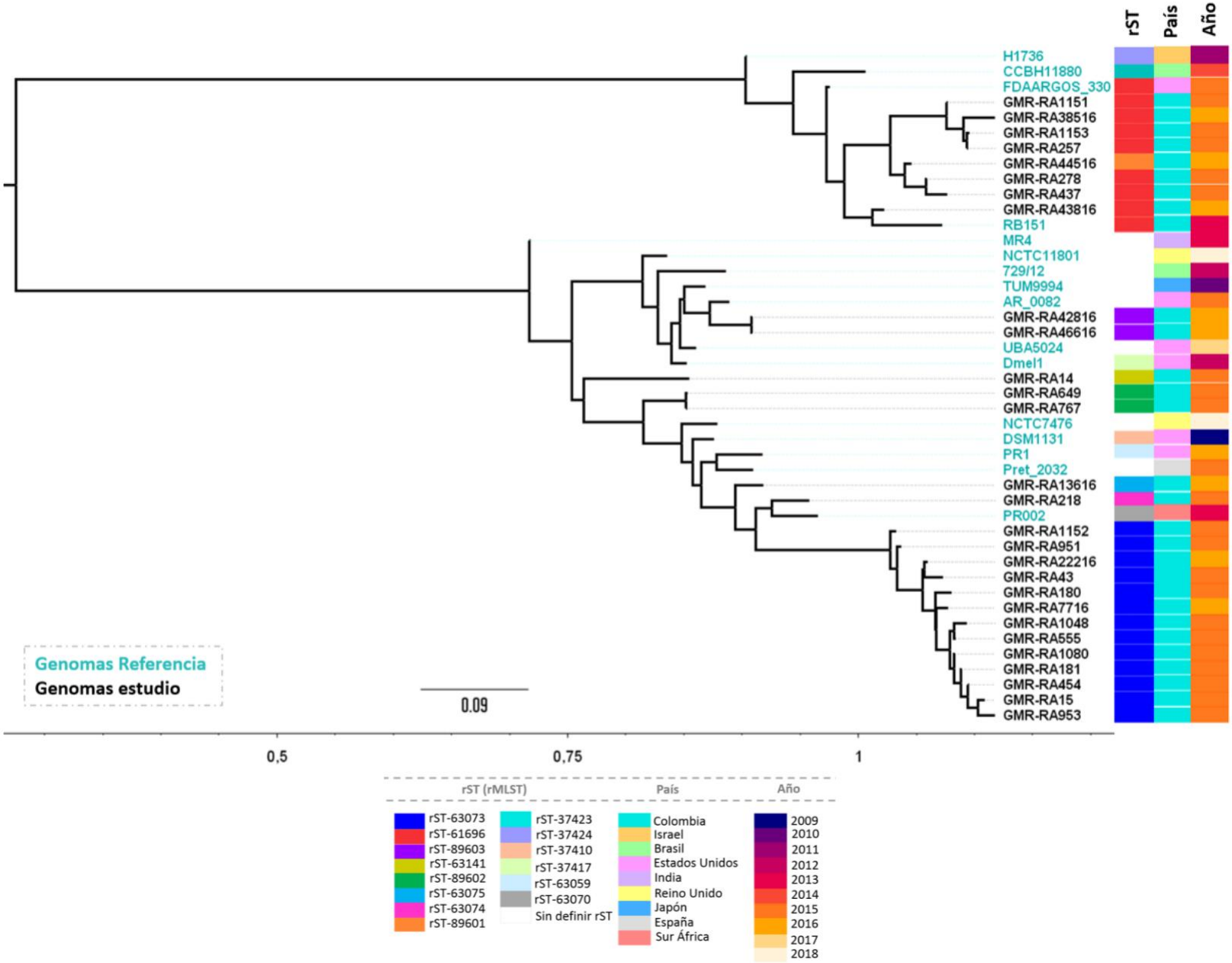
En la Figura 4-20 se observa el árbol filogenético de la comparación de los 28 genomas de *P. rettgeri* del estudio junto a los 16 genomas de referencia obtenidos del Genbank (véase sección 2-15), construido a través de Roary empleando el pangenoma y la inferencia de los genes central y accesorio; en cuadros de colores una serie de metadatos que incluyen información sobre los genomas de *P. rettgeri* del estudio y los genomas de referencia [rST asignado, país y año de recolección] con el propósito de observar en conjunto tanto las variantes genómicas como socio-demográficas de los aislamientos. Se observa en la gráfica que todos los aislados descienden de un ancestro común, sin embargo cuando analizamos las relaciones filogenéticas de los rSTs mayoritarios: rST-63073 (representado en la columna rST por bloques azules oscuros) y rST-61696 (representado en la columna rST por bloques rojos) podemos determinar por las distancias la amplia dispersión de los aislamientos pertenecientes a cada rST.

Cuando observamos el árbol filogenético el rST mayoritario (rST-63073) se ve relacionado con el genoma de referencia PR002, genoma definido con el rST-63070 y obtenido de una fuente de orina humana en Sur África en el año 2013. El rST mayoritario (rST-63073) hasta la fecha está únicamente reportado en Colombia y se destaca la importante distribución en Bogotá y los diferentes hospitales de la capital. El segundo rST mayoritario (rST-61696) se encuentra principalmente relacionado con el genoma colombiano RB151, previamente

reportado en la ciudad de Bucaramanga en el año 2013 y aislado de una muestra de orina, así mismo, observamos una estrecha relación de los aislamientos de este rST (rST-61696) con el genoma de referencia FDAARGOS_330 reportado en Estados Unidos en el Children's National Hospital en el año 2015 y obtenido también a partir de orina; estos resultados sugieren en primer lugar la posible circulación del rST-61696 desde el año 2013 en el país y en tres sitios geográficos diferentes de Colombia: Bucaramanga, Bogotá y Cundinamarca, así mismo también sustenta la posibilidad de la circulación de este rST (rST-61696) en dos países diferentes Colombia y Estados Unidos.

El rST-89603 encontrado en Colombia, circulando en Risaralda-Pereira está relacionado con el genoma de referencia AR_0082 genoma reportado por el *Centers for Disease Control and Prevention* de Estados Unidos y proveniente probablemente de fuentes humanas pero no asociado a ningún rST. El árbol filogenético nos muestra también la relación existente entre este rST (rST-89603) y los genomas de referencia UBA5024 y Dmel1, obtenidos de otros tipos de fuente: UBA5024 de metal/plástico de un proyecto de metagenómica terrestre en Estados Unidos y Dmel1 de Hemolinfa de *Drosophila melanogaster* también obtenido en los Estados Unidos, este genoma fue asignado al rST-37417. Aunque estos genomas de referencia (AR_0082, UBA5024 y Dmel1) no comparten el rST-89603, fueron todos obtenidos en USA y el árbol filogenético demuestra que comparten una relación muy cercana entre ellos y con los genomas del rST-89603 (GMR-RA42816 y GMR-RA46616), estos resultados podrían sugerir primero la propagación inminente de especies de *P. rettgeri* a fuentes de recolección no humanas y a que el rST-89603 identificado hasta el momento únicamente en Colombia está fuertemente asociado a genomas de Estados Unidos.

Figura 4-20 Árbol filogenético genomas de *P. rettgeri* del mundo.

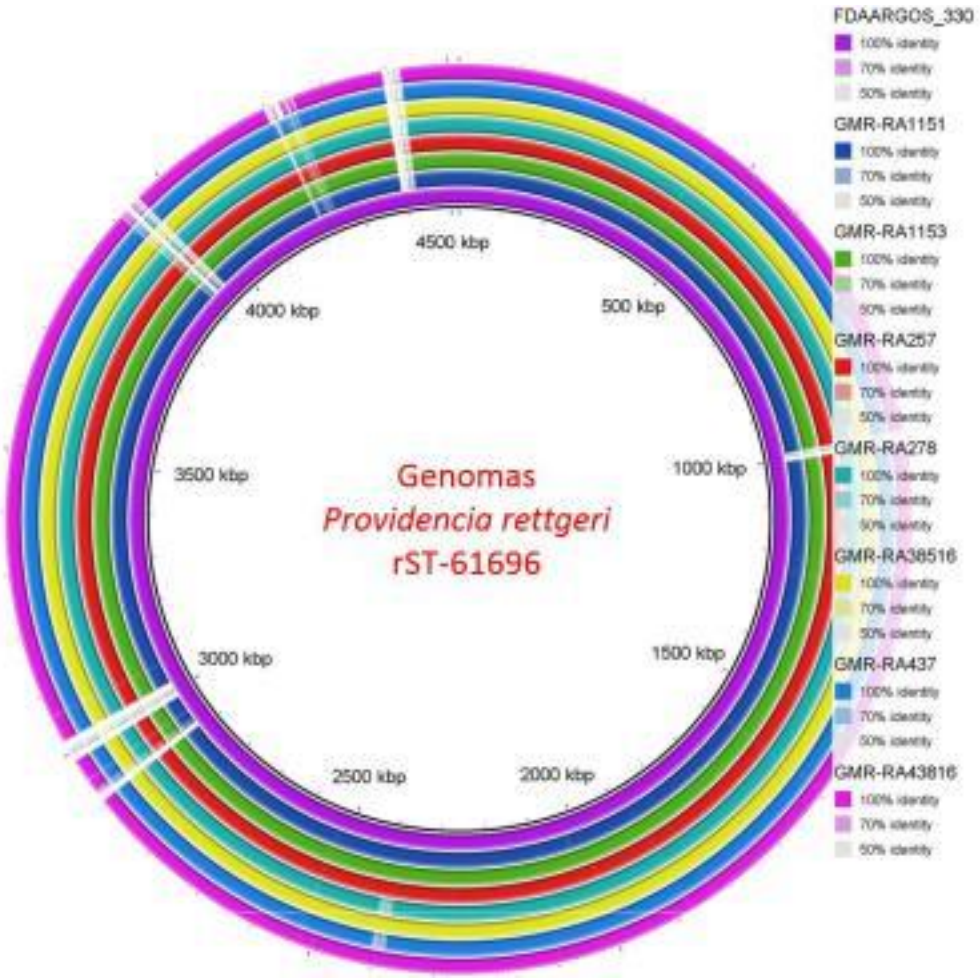


Los demás rSTs de *P. rettgeri* del estudio: rST-63141, rST-89602 y rST-63075, no se encuentran relacionados estrechamente con ningún genoma de referencia presentado ni en Colombia ni en ninguno de los otros países donde se han secuenciado genomas de *P. rettgeri*. El rST-63074 se encuentra relacionado al igual que el rST mayoritario al genoma de referencia PR002 presentado por Sur África identificado con el rST-63070.

4.16.3 Visualización comparativa a nivel genómico de rSTs mayoritarios (rST-63073 y rST-61696)

Se realizó un análisis comparativo del genoma de *P. rettgeri* para los 20 genomas con rSTs más prevalentes: 13 genomas del rST-63073 y para los 7 genomas del rST-61696. Con el fin de proporcionar una imagen de la diversidad genética dentro de esta especie, se construyeron mapas circulares de los genomas utilizando el software BRIG (*BLAST Ring Image Generator*) (Alikhan et al., 2011). Una inspección visual de la alineación circular de los genomas de *P. rettgeri* del rST-61696 (Figura 4-21), mostró que las secuencias genómicas de *P. rettgeri* GMR-RA1151, GMR-RA1153, GMR-RA257, GMR-RA278, GMR-RA38516, GMR-RA437 y GMR-RA43816 son altamente similares, donde la mayoría de las regiones genómicas comparadas revelan una identidad de más del 90% contra el genoma de referencia FDAARGOS_330.

Figura 4-21 Visualización comparativa circular de los genomas completos de *P. rettgeri* rST-61696.

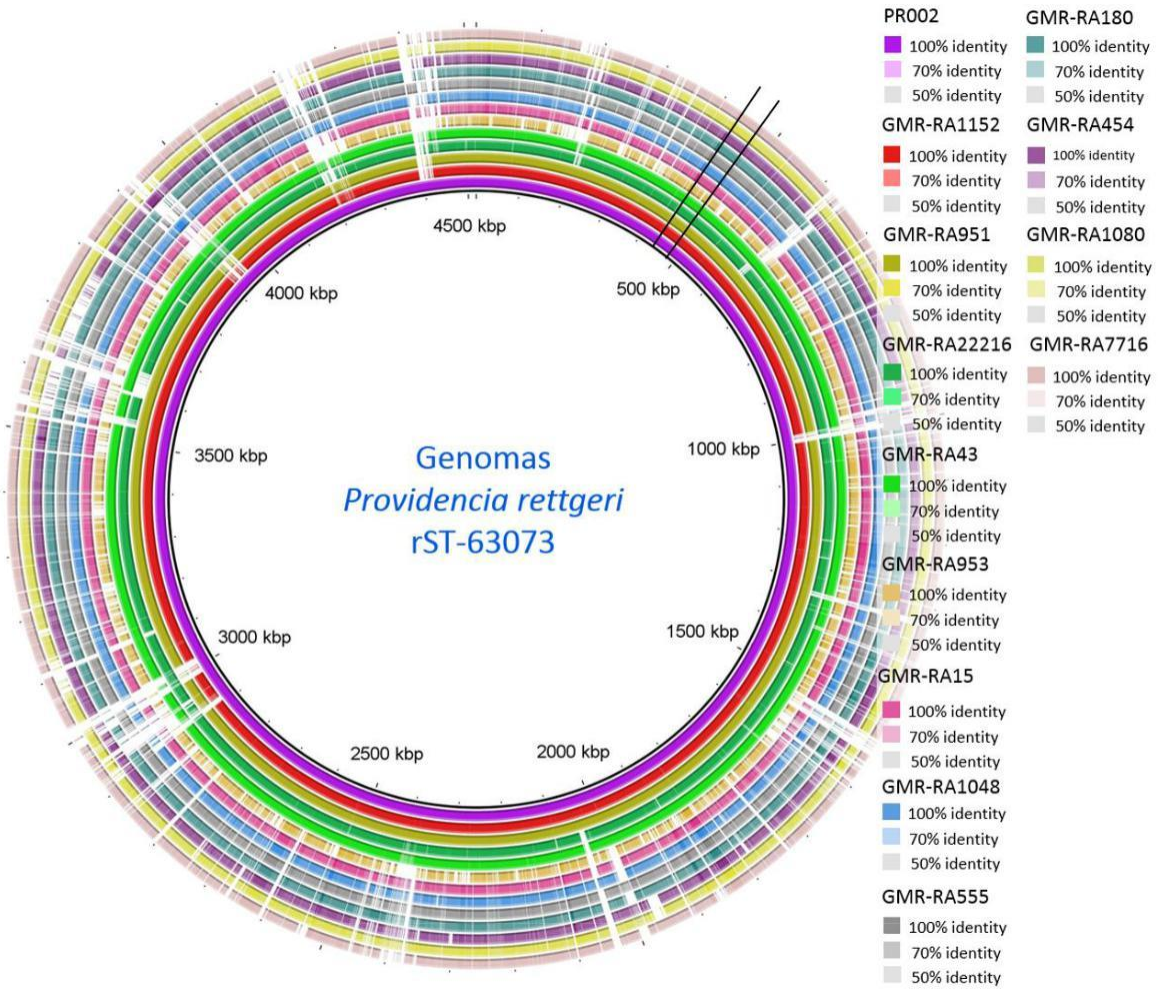


Comparación del genoma completo de aislamientos de *P. rettgeri* rST-61696 (utilizando como genoma de referencia: *P. rettgeri* FDAARGOS_330). Del anillo interior al exterior: GMR-RA1151, GMR-RA1153, GMR-RA257, GMR-RA278, GMR-RA38516, GMR-RA437, GMR-RA43816. La intensidad de color en cada anillo representa la identidad de coincidencia de BLAST.

No obstante, la inspección visual de la alineación circular de los genomas de *P. rettgeri* del rST-63073 reveló una similitud de secuencia menor (Figura 4-22). Únicamente las secuencias genómicas de *P. rettgeri* GMR-RA1152, GMR-RA951, GMR-RA22216 y GMR-RA43 fueron altamente similares, la mayoría de las regiones genómicas comparadas revelaron una identidad de más del 90% contra el genoma de referencia PR002. Los demás genomas presentaron regiones genómicas con una identidad más baja. Solamente la región ubicada entre 470-490 kbp fue idéntica en 12 genomas, al genoma de referencia de alineación PR002, excepto para *P. rettgeri* GMR-RA953. El análisis por WGS, permitió

determinar en estas regiones genes relacionados con sistemas de secreción tipo IV (*type IV conjugative transfer system protein TraC, type IV conjugative transfer system protein TraU, type IV conjugative transfer system signal peptidase*) y genes relacionados con la presencia de sideróforos (putative siderophore biosynthetic protein (thioesterase), *putative non-ribosomal peptide synthase (putative siderophore synthase).*

Figura 4-22 Visualización comparativa circular de los genomas completos de *P. rettgeri* rST-63073.



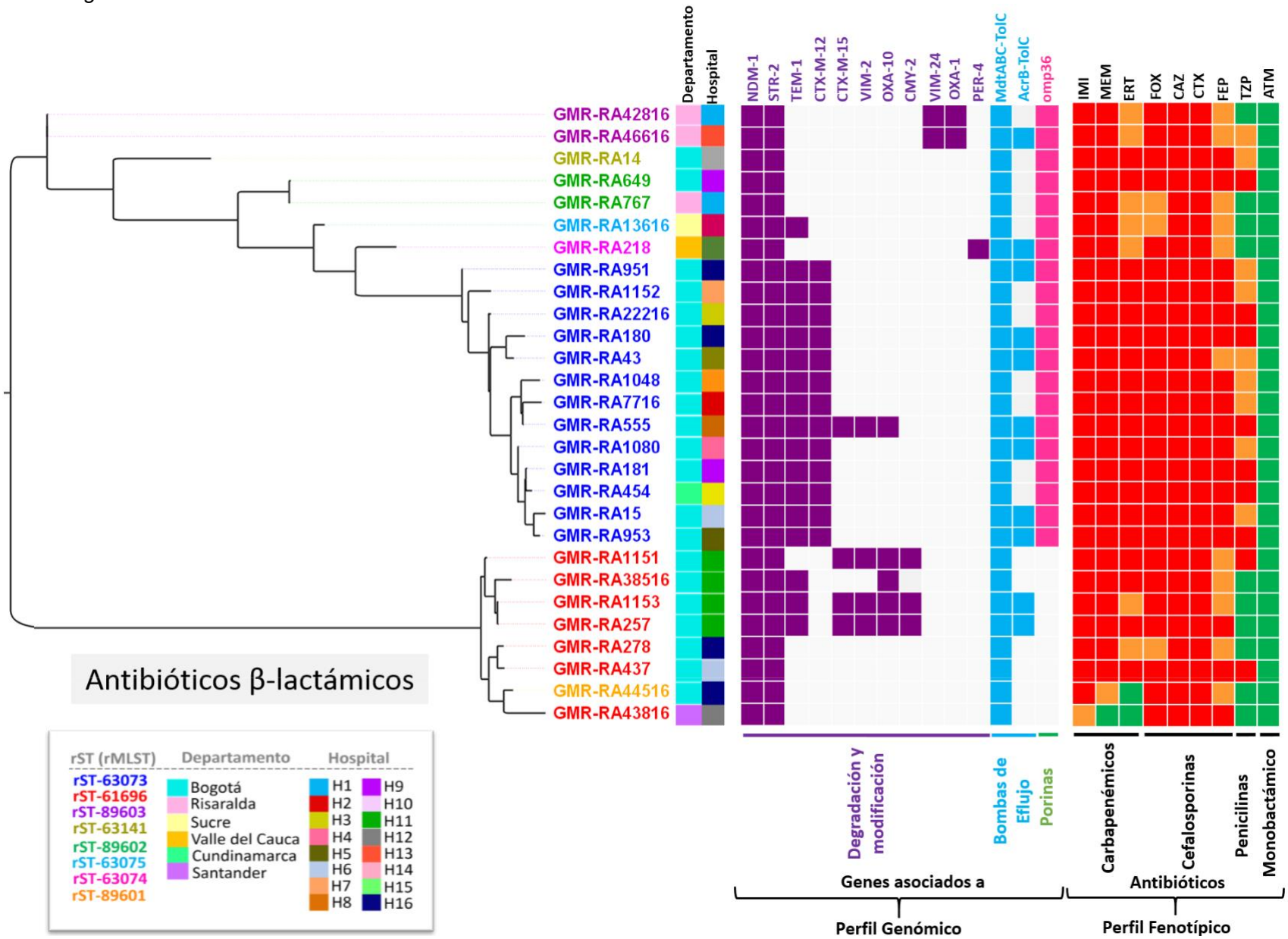
Comparación del genoma completo de aislamientos de *P. rettgeri* rST-63073 (utilizando como genoma de referencia: *P. rettgeri* PR002). Del anillo interior al exterior: GMR-RA1152, GMR-RA951, GMR-RA22216, GMR-RA43, GMR-RA953, GMR-RA15, GMR-RA1048, GMR-RA555, GMR-RA180, GMR-RA454, GMR-RA1080, GMR-RA7716. La intensidad de color en cada anillo representa la identidad de coincidencia de BLAST.

4.17 Correlación del perfil fenotípico y el perfil genómico de resistencia a antibióticos betalactámicos

La figura 4-23 muestra la comparación del perfil fenotípico obtenido a antibióticos betalactámicos por Kirby Bauer correlacionado con el perfil genómico obtenido a partir de WGS, así mismo incluye el resultado del árbol filogenético obtenido a partir del pangenoma, la tipificación obtenida por rMLST y los metadatos relacionados con el departamento y hospital de recolección. Los resultados fenotípicos y genotípicos de la resistencia a antibióticos betalactámicos presentaron una alta concordancia para 27 (96.4%) de 28 aislamientos, el perfil de susceptibilidad es compatible con el perfil genotipo predicho, el cual incluyó 9 clases de antimicrobianos en la categoría antibióticos betalactámicos. Solo 1 aislamiento (3.57%) presentó resultados discordantes. Los datos de resistencia derivados del genoma indicaban un perfil de resistencia, pero fue fenotípicamente susceptible a unos de los antimicrobianos analizados. El aislamiento que presentó el resultado discordante (GMR-RA43816), según los resultados de WGS era resistente a los carbapenémicos (debido a que contenía el gen *bla*NDM-1), pero el aislamiento fue susceptible según los puntos de corte actuales del CLSI para enterobacterias a los carbapenémicos: meropenem y ertapenem.

Así mismo, a partir de la comparación del perfil fenotípico y el perfil genómico se pudo definir de manera general el principal perfil de resistencia y el genotipo más prevalente a antibióticos betalactámicos en los 28 aislamientos de *P. rettgeri*: se detectó de manera general en los aislamientos del estudio la resistencia a imipinem – meropenem – ertapenem – cefoxitina – ceftazidima – cefotaxima – cefepima siendo el perfil MDR más frecuente presente en el 92.8% de los aislamientos de *P. rettgeri* (n=26), exceptuando dos aislados (7.2%, n=2). En todos los aislamientos con este perfil se pudo definir, el genotipo subyacente más frecuente: *bla*NDM-1, *bla*SRT-2 y MdtABC-TolC.

Figura 4-23 Comparación del perfil genómico obtenido a partir de WGS y el perfil fenotípico de resistencia a antibióticos betalactámicos en aislados de *P. rettgeri.*



Al analizar la comparación de los perfiles (Figura 4-23), podemos determinar correlaciones importantes determinadas a partir del rST. La correlación del perfil fenotípico y el perfil genómico del rST mayoritario (rST-63073), detectó en los 13 genomas la resistencia a IMI– MEM – ERT – FOX – CAZ – CTX – FEP y TZP, siendo el genotipo más frecuente para este rST: *bla*NDM-1, *bla*SRT-2, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M-12, MdtABC-TolC, y *omp36*. Este genotipo principal cuenta con genes en todas las categorías propuestas para resistencia a betalactámicos: degradación y modificación, bombas de Eflujo y porinas. Cabe destacar que entre los genes encontrados y el perfil de susceptibilidad, la metalobetalactamasa *bla*NDM-1 y la bomba de eflujo MdtABC-TolC están relacionadas principalmente con resistencia a carbapenémicos (IMI – MEM – ERT), la porina *omp36* está asociada también con resistencia a carbapenémicos pero principalmente a meropenem, mientras que la resistencia a cefalosporinas (CAZ – CTX) con betalactamasas de espectro extendido (BLEE) como *bla*CTX-M-12 y la resistencia a piperacilina / tazobactam (PTZ) se ve en la mayoría de los casos influenciada por *bla*TEM-1. Este genotipo (*bla*NDM-1, *bla*SRT-2, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M-12, MdtABC-TolC, y *omp36*) se encuentra generalizado en Bogotá, en nueve hospitales diferentes y su propagación se extendió al departamento de Cundinamarca. Algunos de los genomas ubicados dentro de este rST contienen a su vez otros genes que también se correlacionan con el fenotipo, GMR-RA555 posee tres betalactamasas más *bla*CTX-M-15, *bla*VIM-2 y *bla*OXA-10 y más del 50% de los genomas de este rST (53.8%), contienen la bomba de eflujo AcrB-TolC.

Con respecto al segundo rST mayoritario (rST-61696) y la comparación de los perfiles (Figura 4-23) se apreció en los 7 genomas la resistencia a IMI – FOX – CAZ – CTX y FEP, siendo el genotipo más frecuente de este rST: *bla*NDM-1, *bla*SRT-2 y MdtABC-TolC; el 57,1% de los genomas de este rST (GMR-RA1151, GMR-RA38516, GMR-RA1153 y GMR-RA257) presentaron a su vez otros genes también relacionados con resistencia a betalactámicos: *bla*TEM-1, *bla*CTX-M-15, *bla*VIM-2, *bla*OXA-10 y *bla*CMY-2, siendo su arsenal genómico más robusto, estos aislados con una cantidad mayor de genes se encontraron circulando en Bogotá en la misma institución hospitalaria. Este genotipo presentado por este rST evidenció genes en las categorías de degradación y modificación y bombas de Eflujo, pero no incluyó genes asociados a porinas. Se observa una concordancia buena entre los genes encontrados y las susceptibilidades esperadas, *bla*NDM-1, *bla*VIM-2, *bla*OXA-10 y MdtABC-TolC están relacionados con resistencia a carbapenémicos y *bla*SRT-2, *bla*CTX-M-15 y *bla*CMY-2 con resistencia a cefalosporinas;

sin embargo la resistencia a TZP fue variable, el gen *bla*TEM-1 estuvo presente en tres aislamientos los cuales presentaron susceptibilidad y dos aislamientos que no presentaban *bla*TEM-1 fueron resistentes a esta ureidopenicilina, no obstante está variabilidad es observa en varios aislados de enterobacterias (Schechter et al., 2018). Un único aislado presentó discrepancias (GMR-RA43816), el cual aunque poseía el gen *bla*NDM-1 fue sensible a los carbapenémicos meropenem y ertapenem y presentó una susceptibilidad intermedio para imipinem.

Para los demás rSTs (rST-89603, rST-63141, rST-89602 y rST-63971), la correlación del perfil fenotípico y el perfil genómico detectó en los genomas la resistencia a IMI – MEM – ERT – FOX – CAZ – CTX y FEP, siendo el genotipo más usual: *bla*NDM-1, *bla*SRT-2, MdtABC-TolC, y *omp36.* Este genotipo al igual que el presentado por el rST mayoritario (rST-63073) presenta genes en las tres categorías de resistencia a betalactámicos: degradación y modificación, bombas de eflujo y porinas. La relación entre el perfil fenotípico y genotípico es coherente: la betalactamasa *bla*NDM-1, la bomba tripartita MdtABC-TolC y la porina omp36 están relacionados con resistencia a carbapenémicos así como *bla*SRT-2 a cefalosporinas. Algunos de los genomas ubicados dentro de estos rSTs involucran a la vez otros genes que también se correlacionan con el fenotipo y que se encuentran en departamentos específicos de Colombia: GMR-RA4281 y GMR-RA46616 pertenecientes al rST-89603 y ubicados en Risaralda contienen además genes *bla*VIM-24
y *bla*OXA-1, así como el genoma GMR-RA218 perteneciente al rST-63074 y ubicado en el Valle del Cauca contiene el gen *bla*PER-4.

4.18 Correlación del perfil fenotípico y el perfil genómico de resistencia a antibióticos No betalactámicos

La Figura 4-24 muestra la comparación del perfil fenotípico obtenido a antibióticos No betalactámicos correlacionado con el perfil genómico, la figura incluye el resultado del árbol filogenético, la tipificación a partir del rMLST y los metadatos relacionados con departamento y hospital de recolección. Los resultados fenotípicos y genotípicos de la resistencia a antibióticos No betalactámicos se correlacionaron adecuadamente para fluoroquinolonas (96.8%) y para sulfonamidas-diaminopirimidinas (92.8%), para los

aminoglucósidos la concordancia fue aceptable con 19 (67.8%) de 28 aislamientos que tuvieron resultados concordantes en su perfil de susceptibilidad. Hubo 9 aislamientos que tuvieron un resultado discrepante (32,1%) donde se predijo que los aislamientos eran resistentes a partir de los datos derivados del genoma, pero eran fenotípicamente susceptibles al antimicrobiano correspondiente, esto se define por terminología internacional como errores mayores (genotípicamente resistentes pero fenotípicamente susceptibles), en lugar de errores muy importantes (donde los aislados son genotípicamente susceptibles pero fenotípicamente resistentes) (Do Nascimento et al., 2017) (Sadouki et al., 2017). Nueve aislamientos en los que se detectó múltiples genes *aad, aac, ant* y *aph* fueron fenotípicamente susceptibles a uno o a los dos aminoglucósidos evaluados (gentamicina y amikacina).

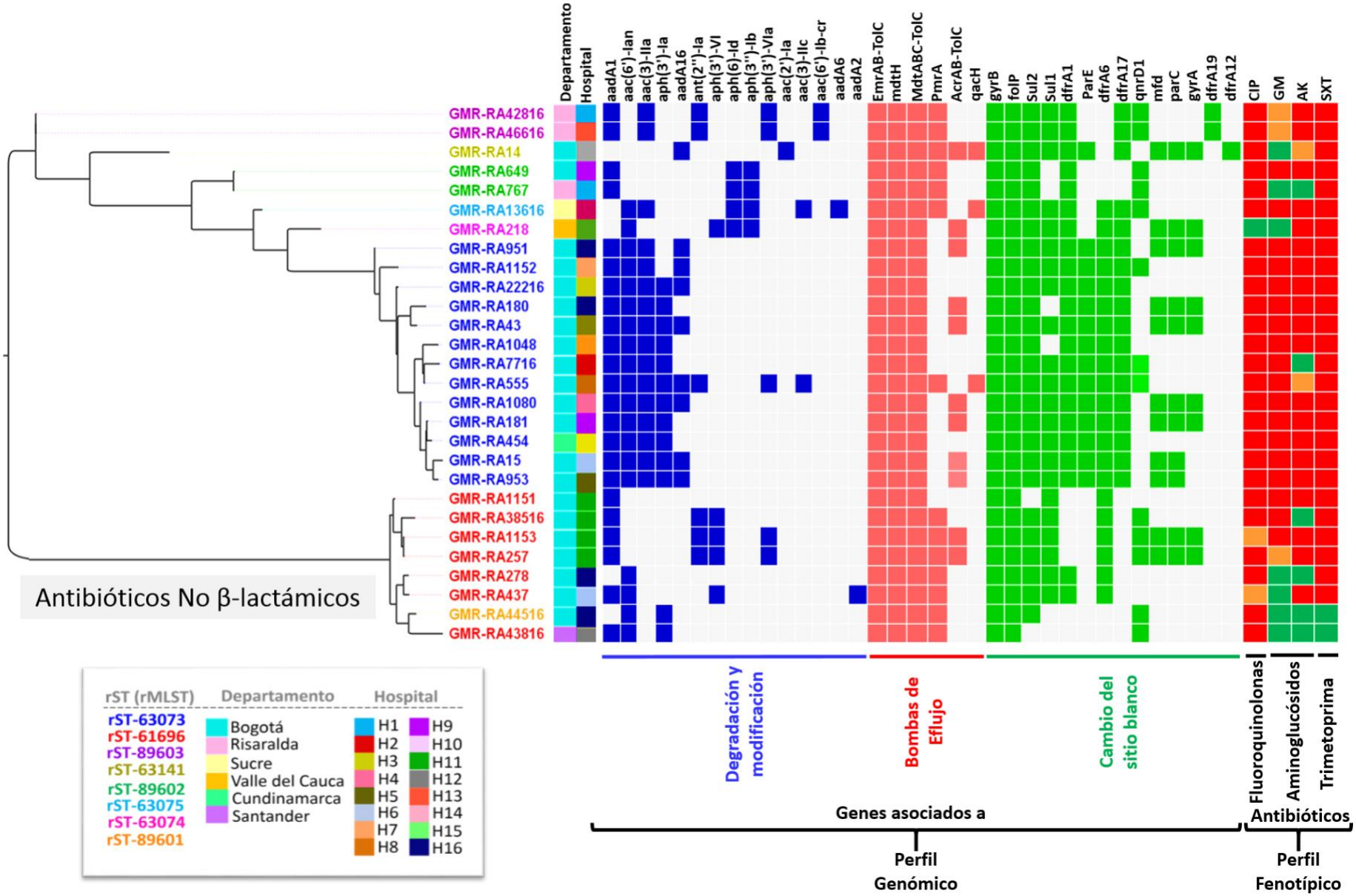
La comparación del perfil fenotípico y el perfil genómico pudo definir de manera general el principal perfil genotípico más prevalente y frecuente a antibióticos No betalactámicos en los 28 aislamientos de *P.* rettgeri del estudio*:* EmrAB-TolC, mdtH, MdtABC-TolC, *gyrB y folP.* Al analizar la comparación de los perfiles (Figura 4-24), podemos determinar correlaciones importantes determinadas a partir del rST. La correlación del perfil fenotípico y el perfil genómico del rST mayoritario (rST-63073), detectó en los 13 genomas la resistencia a CIP, AK y SXT, siendo el genotipo más frecuente para este rST: *aadA1, aac(6')-Ian, aac(3)-IIa,* EmrAB-TolC, mdtH, MdtABC-TolC, *gyrB, folP, Sul2, dfrA1, ParE, dfrA6* y *dfrA17*. Este genotipo principal cuenta con genes en todas las categorías propuestas para resistencia a No betalactámicos: degradación y modificación, bombas de eflujo y cambio del sitio blanco. Cabe destacar la adecuada concordanciaentre los genes encontrados y el perfil de susceptibilidad. Los genes *aadA1, aac(6')-Ian, aac(3)-IIa* y la bomba MdtABC-TolC están relacionados con resistencia a aminoglucósidos (GM – AK) , los genes *gyrB* y *ParE* y las bombas EmrAB-TolC y mdtH están relacionadas con resistencia a CIP y los genes *folP, Sul2, dfrA1, dfrA6* y *dfrA17* con resistencia a (SXT). Este genotipo está extendido en Bogotá en aislamientos de *P. rettgeri*, en nueve hospitales diferentes y su propagación también se observó en Cundinamarca. Un único aislado presentó discrepancias (GMR-RA7716), el cual aunque poseía genes *aad, aac* y *aph* y la bomba MdtABC-TolC fue sensible al aminoglucósido amikacina.

Al observar el segundo rST mayoritario (rST-61696) y la comparación de los perfiles (Figura 4-24) se apreció en los 7 genomas la resistencia general a CIP, siendo el genotipo más frecuente de este rST: EmrAB-TolC, mdtH, MdtABC-TolC, *gyrB* y *folP*. Este genotipo

presentado por este rST evidenció genes en las categorías de bombas de Eflujo y cambio del sitio blanco. Se observó una disminución en la correlación en comparación con los demás resultados, solo tres (GMR-RA1151, GMR-RA1153, GMR-RA257) de los siete genomas presentados en este rST presentó correlación entre los genes encontrados y las susceptibilidades esperadas, la resistencia a ciprofloxacina se ve relacionada con los genes EmrAB-TolC, mdtH y *gyrB*; la bomba de eflujo MdtABC-TolC más los diferentes genes *aad, aph* y *ant* que se presentan de forma diversa en cada aislamiento se asocian con la resistencia a aminoglucósidos (AK – GM) y *folP* se ve relacionado con la resistencia a (SXT). Los genomas GMR-RA38516, GMR-RA278, GMR-RA437 y GMR-RA43816 presentaron discrepancias asociadas con resistencia a aminoglucósidos, aunque poseían la bomba MdtABC-TolC y diversos genes *aad, aac, aph* y *ant* fueron sensibles a GM – AK o en algunos de los casos susceptibles a los dos.

Para los demás rSTs (rST-89603, rST-63141, rST-89602 y rST-63971), la correlación del perfil fenotípico y el perfil genómico detectó en los genomas la resistencia en la totalidad de los aislados a SXT siendo el genotipo más usual: EmrAB-TolC, mdtH, MdtABC-TolC, *gyrB, folP, Sul2* y *dfrA1*. Este genotipo presenta genes en las tres categorías de resistencia a No betalactámicos: degradación y modificación, bombas de Eflujo y cambio del sitio blanco. La relación entre el perfil fenotípico y genotípico es coherente para los rSTs: rST-89603 y rST-63075. La presencia de diversos genes *aad, aac, aph* y *ant* junto con la bomba MdtABC-TolC se correlacionan con la resistencia a (GM–AK), las bombas EmrAB-TolC, mdtH, MdtABC-TolC y los genes *gyrB* y *Sul2* se correlacionan con resistencia a CIP, así como la presencia de los genes de *folP* y *Sul2* se correlacionan con la resistencia a SXT. El rST-63141 y el genoma GMR-RA767 perteneciente al rST-89602 presentaron discrepancias en los aminoglucósidos, aunque poseía genes *aad, aac* y *aph* fueron ambos sensibles a la GM y GMR-RA767 también a la AK. Una discrepancia más fue observada en el rST-63074 aunque poseía los genes *gyrB, gyrA, parC, mfd* y las bombas EmrAB-TolC, mdtH y AcrAB-TolC fue sensible a la ciprofloxacina.

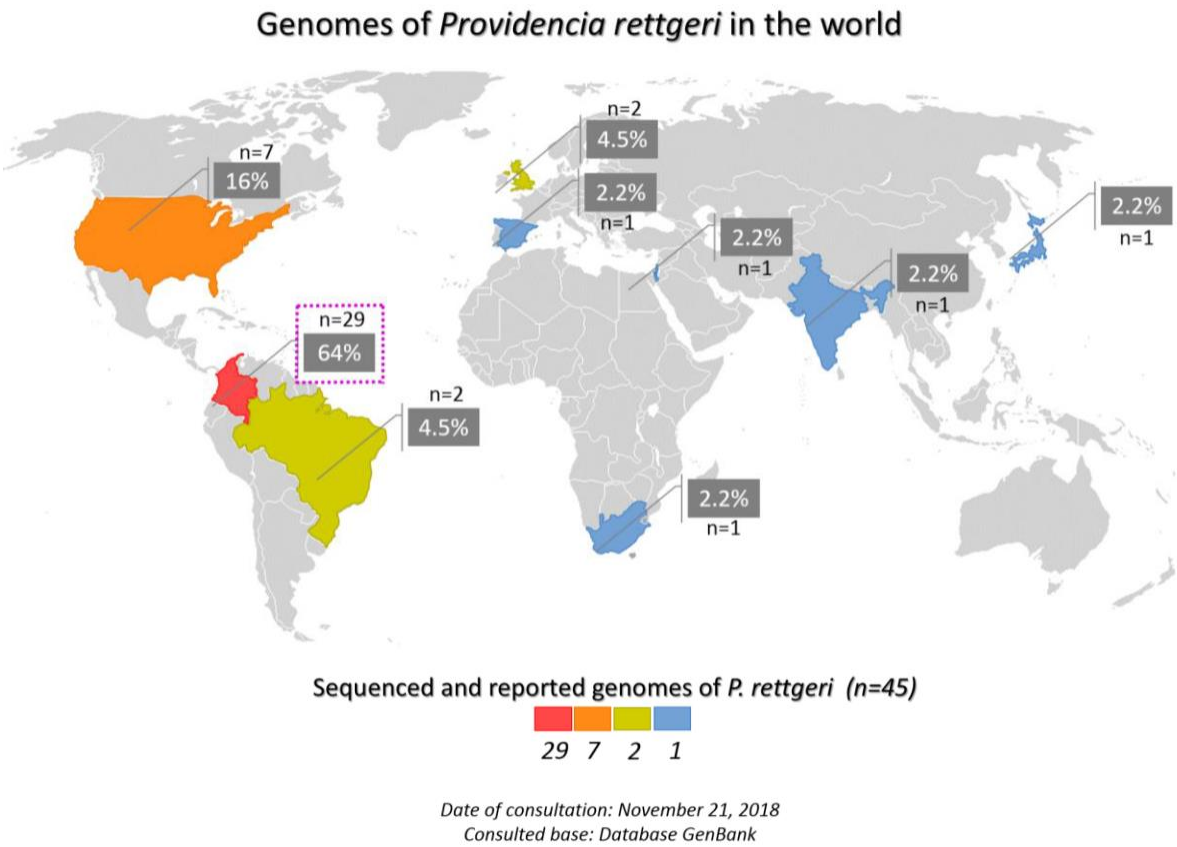
Figura 4-24 Comparación del perfil genómico obtenido a partir de WGS y el perfil fenotípico de resistencia a antibióticos No betalactámicos en aislados de *P. rettgeri.*



4.19 Genomas secuenciados de *P. rettgeri* en la actualidad

A partir de la secuenciación de genoma completo, se informó la secuencia de 28 genomas de *P. rettgeri*. En la figura 4-25 se aprecia que el estudio aportará a la base bacteriana de *P. rettgeri* el 62% de los genomas secuenciados en la actualidad (64% con el aislado colombiano RB151 previamente reportado), siendo Colombia el país con el mayor número de genomas de *P. rettgeri* secuenciados hasta la fecha. Así mismo, podemos apreciar en la Figura 4-25 a Estados Unidos como el segundo país con más genomas reportados de *P. rettgeri* (16%), seguido de Brasil y Reino Unido con un porcentaje de reporte del (4.5%) respectivamente. Los países de Israel, India, Sur África, Japón y España, han reportado a la base de datos únicamente un genoma *de P. rettgeri* por país (2.2%, respectivamente).

Figura 4-25 Genomas secuenciados de *P. rettgeri* en la actualidad.



5. Discusión

P. rettgeri es un patógeno oportunista asociado principalmente con infecciones urinarias, con frecuencia, coloniza catéteres urinarios en pacientes inmunocomprometidos y puede causar brotes hospitalarios (O'Hara et al., 2000). En una revisión realizada por Choi y colaboradores (Choi et al., 2015), *P. rettgeri* fue una de las especies de *Providencia* aisladas con más frecuencia en pacientes con infecciones del tracto urinario asociadas a catéter, siendo la orina la principal fuente de recolección; este resultado se asocia con el obtenido en nuestro estudio donde el 82,1% de los aislamientos provinieron de este origen de recolección; aunque no se tiene conocimiento si los pacientes de nuestro estudio portaban catéteres urinarios, trabajos como el de Choi y un estudio realizado por Wie en 2015 (Wie, 2015), asocian comúnmente aislamientos de *P. rettgeri* a esta condición. Teniendo en cuenta que *P. rettgeri* es un uropatógeno con capacidad de formar ureasa, y observando que la principal fuente de recolección en varios estudios (Choi et al., 2015) (Wie, 2015) y en el presente es la orina, cabe resaltar la ureasa como un importante factor de virulencia en aislados de *P. rettgeri*; esta ureasa se asocia comúnmente con formación de cálculos en el tracto urinario, obstrucción de catéteres urinarios a largo plazo y el desarrollo de pielonefritis aguda (Jones & Mobley, 1987).

En nuestro estudio, el grupo de edad con más aislamientos de *P. rettgeri* fue el formado por los pacientes mayores de 65 años (52%), pacientes que debido a la edad son más propensos a tener enfermedades y complicaciones. Este resultado es comparable con el resultado de Choi y colaboradores (Choi et al., 2015), donde la edad media de los pacientes que desarrollaron una infección por especies de *Providencia* fue de 64,5 años, estos resultados sustentan que este tipo de infecciones están relacionadas comúnmente con el sector etario relacionado con personas mayores. Además en el estudio de Choi (Choi et al., 2015) el 71,4% de los pacientes eran hombres, y en un informe realizado por Saavedra (Saavedra-Rojas et al., 2017) el 85,7% de los aislados de *P. rettgeri* pertenecían

a pacientes masculinos, resultados asociados con este estudio donde el 95% de las infecciones fueron obtenidas de población masculina; esto sugiere la posibilidad de que este tipo de población se ha más propensa a adquirir infecciones por *P. rettgeri.*

P. rettgeri se ha visto implicado en infecciones oculares (Koreishi et al., 2006), diarrea del viajero (Yoh et al., 2005) y, en una baja incidencia, a meningitis (Maiti et al., 2013) y pielonefritis (Lee & Hong, 2011), en nuestro estudio se informa por primera vez a *P. rettgeri* asociado con infecciones en músculo y hueso en un porcentaje de 3.6% respectivamente; estos pacientes fueron diagnosticados con sepsis. En la actualidad se han informado únicamente dos casos de *P. rettgeri* asociados a sepsis (Shaista Nazir *et al.*, 2017) (Sharma et al., 2017); uno relacionado a infección del tracto urinario (Shaista Nazir et al., 2017) y el otro caso relacionado a un menor infante (Sharma et al., 2017); ambos casos fueron asociados a bacteremia, no obstante, nuestros casos de sepsis por *P. rettgeri* son vinculados a muestras poco comunes nunca informadas: tejido muscular y hueso. Además, solo se ha indicado una infección por herida causada por *P. rettgeri* en Guam donde el paciente presentaba como comorbilidad tofos gotosos (gota), nosotros informamos en este estudio una infección también por herida pero donde el paciente presentaba como comorbilidad diabetes mellitus; estos datos sugieren que las heridas en tejidos blandos son propensas a adquirir infección por *P. rettgeri.*

En Colombia durante el año 2015, fue emitido el primer reporte de aislamientos de *P. rettgeri* circulando en el país (Saavedra-Rojas et al., 2017), estos aislamientos fueron recolectados durante el periodo de tiempo 2012 y 2013; el estudio incluyó catorce aislamientos positivos para *bla*NDM-1; el trabajo notificó sobre la circulación de *P. rettgeri* en dos departamentos colombianos: Santander y Cundinamarca; incluyendo dos municipios y la capital (Santander–Bucaramanga, Cundinamarca–Madrid y Bogotá), en nuestro estudio se realiza la notificación de aislamientos de *P. rettgeri bla*NDM-1 circulando también por Bogotá y estos dos departamentos pero en municipios diferentes Santander– Floridablanca y Cundinamarca–Zipaquirá además en nuestro estudio se aprecia que la distribución de *P. rettgeri* en el país ha aumentado, observándose circulación incluso en los departamentos de Risaralda–Pereira, Sucre–Sincelejo, y Valle del Cauca–Cali, estos antecedentes notifican sobre el aumento en la distribución de *P. rettgeri* portando *bla*NDM-1 sobre el territorio colombiano.

Los aislamientos colombianos de *P. rettgeri* del estudio fueron definidos como resistentes a múltiples medicamentos (MDR) según terminología internacional estandarizada (Magiorakos et al., 2012); esto debido a que presentaron resistencia a tres o más familias de antibióticos, es importante señalar que en el trabajo presentado por el INS (Saavedra-Rojas et al., 2017), los aislados de *P. rettgeri* reportados en el periodo 2012-2013 también fueron definidos como MDR, estos resultados sustentan la circulación de aislados MDR de *P. rettgeri* en Colombia desde el año 2012.

De los tres carbapenémicos evaluados (imipinem, meropenem y ertapenem) en nuestro estudio, el carbapenémico con mayor porcentaje de resistencia fue el imipinem (96%), este resultado se correlacionó con el informe presentado por Saavedra y colaboradores (Saavedra-Rojas et al., 2017) donde los aislados colombianos de *P. rettgeri* presentaron un porcentaje de resistencia del 100% a este carbapenémico. El meropenem fue el carbapenémico más afectado comparado con aislamientos de *P. rettgeri* colombianos presentados por el INS durante el año 2012 y 2013 (Saavedra-Rojas et al., 2017); en nuestro estudio el porcentaje de resistencia expresado para meropenem fue del 93%, mientras que para los aislados presentados por el INS el meropenem presentaba tasas de resistencia de tan solo del 78,5%, estos datos señalan como los aislamientos de *P. rettgeri* han aumentado de manera considerable su resistencia al carbapenémico meropenem con el paso de los años.

En cuanto al ertapenem, el comportamiento de la resistencia (68%) fue similar al comportamiento expresado en aislados colombianos de *P. rettgeri* del año 2012 y 2013 (78.5%) (Saavedra-Rojas et al., 2017), aunque se observa una mayor resistencia en este último grupo, nuestro estudio presentó un porcentaje elevado de aislamientos intermedios (25%) más que en 2012 y 2013 (7.1%); este resultado es importante debido a que en clínica la identificación de aislados intermedios puede sugerir a los médicos la no administración del antibiótico debido a su baja sensibilidad. Es importante resaltar que la sensibilidad expresada por nuestros aislamientos fue de tan solo el 3.5% para meropenem y del 7% para ertapenem siendo mucho menos sensibles que los aislados presentados por el INS (Saavedra-Rojas et al., 2017) los cuales presentaban una sensibilidad del 14.2% respectivamente. Esta información en conjunto, sustenta el aumento de la resistencia a carbapenémicos de los aislamientos colombianos de *P. rettgeri* durante el periodo 2015 – 2016 comparados con los aislamientos colombianos publicados en 2012-2013.

A nivel mundial, publicaciones sobre aislamientos de *P. rettgeri* en el continente Americano en países como Ecuador (Zurita, Parra, Gestal, McDermott, & Barba, 2015), Argentina (Pasteran et al., 2014), Uruguay (OPS & OMS, 2014), Canadá (Kus et al., 2011), Brasil (Carmo Junior et al., 2015), México (Barrios et al., 2013) y Estados Unidos (Pollett et al., 2014), así como países del continente asiático: Nepal (Tada et al., 2014), Israel (Gefen-Halevi et al., 2013), India (Lascols et al., 2011), China (G. Zhou et al., 2014) y Pakistán (Perry et al., 2011) y un reporte presentado por Sudáfrica (Tshisevhe et al., 2016), informan los elevados niveles de resistencia a antibióticos carbapenémicos en los aislados clínicos de *P. rettgeri*, siendo asociados principalmente con la presencia del gen *bla*NDM-1. Este comportamiento mundial se asemeja con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde los niveles elevados de resistencia a carbapenémicos en *P. rettgeri* se correlacionan principalmente con la presencia del gen *bla*NDM-1, presente en el 100% de los aislados.

En cuanto a las cefalosporinas los aislamientos de nuestro estudio fueron 100% resistentes a cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y cefotaxima) estos hallazgos corroboran los resultados del estudio realizado en Colombia durante el año 2017 (Saavedra-Rojas et al., 2017) en el que se informa aislados de *P. rettgeri* con la misma condición de resistencia. En cuanto a la cefalosporina de cuarta generación: cefepima, el 61% de los aislados fueron resistentes y el 39% SDD, estos aislamientos de *P. rettgeri* con características SDD, solo se ha reportado en un aislado en Ecuador (Zurita *et al*., 2015), esta característica ofrece cierta ventaja al personal a nivel clínico, debido a que las bacterias con esta condición pueden ser tratadas con cefepima, siempre y cuando se trabaje bajo el régimen de dosificación específico. Con respecto a los demás betalactámicos, cabe destacar que el carbapenémico más activo fue la ureidopenicilina: Piperacilina/Tazobactam el 36% de los aislados fueron sensibles, el presente estudio es el único documentando para *P. rettgeri* con esta condición. Todos los aislados de nuestro estudio fueron sensibles al monobactámico - aztreonam, esta característica de los aislados es relevante debido a que esta particularidad está siendo estudiada como una potencial estrategia para tratar aislamientos resistentes a carbapenémicos mediante el uso de una combinación de aztreonam y avibactam (inhibidor de betalactamasas) (Sader *et al*., 2018).

La detección temprana de carbapenemasas en los laboratorios de microbiología a través del uso de pruebas de tamizaje es importante para prevenir la diseminación de estos determinantes de resistencia en el ambiente hospitalario. En este estudio se observó que la identificación de carbapenemasas clase B (tipo NDM) usando la prueba con EDTA/SMA

fue 100% sensible y específica, mientras que el THM fue negativo en todos los aislamientos, teniendo una baja especificidad, este comportamiento es común en diversos estudios fenotípicos para detección de carbapenemasas reportados en la literatura (Carvalho-Assef et al., 2013), (Tada et al., 2014) (Carmo Junior et al., 2015). La edición 28th del CLSI publicada en 2018 desarrolló estándares de implementación e interpretación actualizados que permiten la detección mejorada de carbapenemasa tipo NDM y de otras carbapenemasas de importancia clínica (como KPC, otras MBLs y OXA-48-like) sustituyendo el método de Hodge, debido a su baja sensibilidad y especificidad e informando la implementación de un método nuevo y mejorado, el Triton Hodge Test (THT) (CLSI, 2018). La implementación de estos nuevos estándares en los sistemas de laboratorio tomará tiempo, y en la actualidad se espera que la implementación de pruebas moleculares y genómicas para la identificación oportuna de genes asociados a resistencia pueda llevarse en el ambiente hospitalario. Posibilidad cada vez más factible en el ámbito clínico, por ejemplo estudios en Alemania (Mellmann et al., 2011) y Australia (Sherry et al., 2013) ya han implementado el uso de genómica en pacientes hospitalizados y los resultados han generado un importante avance en este campo.

Los resultados de la resistencia subrayan la falta de opciones disponibles para el tratamiento de organismos *P. rettgeri* productores de NDM-1. Las figuras 4-9 y 4-10 muestran los patrones extensos de resistencia que afectan a los aislados del estudio, donde los carbapenémicos no son una opción de tratamiento. Además de esto desafortunadamente, antimicrobianos como la colistina y la tigeciclina que en la actualidad se han vinculado como antibióticos para tratar microorganismos multirresistentes productores de carbapenemasa (Stock, 2014), no son opción de tratamiento para aislados de *P. rettgeri*, debido a la resistencia natural expresada por este microrganismo frente a estos antibióticos (Rose & Rybak, 2006) (J. Li, Nation, Milne, Turnidge, & Coulthard, 2005) (Choi et al., 2015), dejando una situación aún más desalentadora para el tratamiento de estas infecciones. El presente estudio alerta sobre la necesidad de realizar en Colombia más estudios epidemiológicos que permiten definir la situación actual de *P. rettgeri* portando NDM-1, dada la gran resistencia a los medicamentos y el riesgo de transmisión de paciente a paciente asociados con aislados que producen NDM-1; se deben unir esfuerzos para definir enfoques de precaución para proteger a los pacientes ingresados en el hospital e implementar medidas de control de infecciones para controlar la propagación de estas cepas resistentes.

La secuenciación de genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) es un método integral que permite el análisis de genomas completos (Ng & Kirkness, 2010). La rápida reducción de los costos de secuenciación y la capacidad de producir grandes volúmenes de datos con los secuenciadores actuales hacen que WGS sea una herramienta poderosa para la investigación genómica (Buermans & den Dunnen, 2014). En la actualidad, la secuenciación de genomas completos microbianos ha aumentado de una manera exponencial (Eduard Guzmán, Antoni Romeu, & antiago Garcia-Vallve, 2008) (Quainoo et al., 2017). No obstante, eran muy pocos los genomas secuenciados de *P. rettgeri*, aun observando su potencial como agente nosocomial; nuestro trabajo permitió aportar a la base de genómica de *P. rettgeri* el 62% de los genomas actualmente secuenciados para este género. Este aporte es de gran utilidad debido a que un mayor número de genomas en las bases de datos permite aportar un mayor conocimiento del género, establecer diferencias entre especies y obtener información relevante para la investigación actual como la obtención de perfiles genómicos y la posibilidad de predecir brotes epidémicos y establecer patrones de resistencia o susceptibilidad.

La secuenciación de genoma completo además tiene un gran potencial para identificar perfiles completos de resistencia en un microrganismo. Esta tecnología, permite recuperar el conjunto completo de genes que codifican la resistencia de la secuencia genómica de un aislado (Oniciuc et al., 2018). Nuestro estudio permitió obtener el mayor número de genes de resistencia asociado~~s~~ a varias categorías de antibióticos nunca antes informados en aislados clínicos de *P. rettgeri;* identificando un total 116 genes diferentes mediadores de resistencia, según los datos de WGS. Las bombas de eflujo fueron el mecanismo con el mayor porcentaje de presencia (41.4%), identificando en total 19 diferentes sistemas de bombeo de eflujo que se sabe están involucrados en la resistencia a los medicamentos (Tabla 4-5), 6 seis de ellos: cuatro pertenecientes a la familia MFS (EmrAB-TolC, tetA, tetR, PmrA) y dos a la familia RND (AcrAB-TolC, MdtABC-TolC) informados previamente en un aislamiento israelí de *P. rettgeri* (Olaitan et al., 2015) y 13 nuevos sistemas de bombeo nunca antes informados para aislados de *P. rettgeri*, diez de ellos pertenecientes a la familia MFS (RosAB, emrD, mdtH, cmlA5, cmlA1, tetD, tetY, tet(B), tet(59), mdtG) y 3 a la familia SMT (qacH, abeS, emrE). Así mismo los genes asociados con degradación y modificación de antibióticos fueron el segundo mecanismo con mayor porcentaje (32.8%) siendo las betalactamasas las principales enzimas representantes de la categoría. Un total de 29 genes se asociaron al mecanismo cambio del sitio blanco, siendo los genes gyrA,

parC, parE, sul1, sul2 y dfrA1 los únicos reportados hasta ahora en *P. rettgeri* (Olaitan et al., 2015) (R. Alejandro Marquez-Ortiz et al., 2017) y los otros 23 genes reportados por primera vez en este microrganismo (*alaS, gyrB, qnrD1, mfd, GlpT, murA, LpxA, LpxC, rpoB, rpoC, arnA, phoQ, PmrE, PmrF, folP, rpsL, tet34, Erm(42), msrE, dfrA6, dfrA19, dfrA12, dfrA17*). Cabe destacar que en el estudio se identificó un único gen asociado con porinas: omp36, nunca informado en estudios posteriores de *P. rettgeri*.

Con el propósito de asociar estos genes encontrados a partir de WGS a grupos principales de antibióticos empleados en la práctica clínica, para el tratamiento de enterobacterias; se asociaron los antibióticos evaluados en el estudio, a dos conjuntos principales: el grupo de antibióticos betalactámicos, incluyendo: carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y monobactámicos y el grupo de antibióticos No betalactámicos que incluyó: fluoroquinolonas, aminoglucósidos y sulfonamidas/diaminopirimidinas. Referente al perfil genómico obtenido por WGS para los antibióticos betalactámicos, observamos la presencia de tres mecanismos: degradación y modificación, bombas de eflujo y porinas, influenciando en la resistencia expresada a este grupo de antibióticos en los aislados de *P. rettgeri* (Figura 4-12) donde 14 diferentes genes fueron encontrados, siendo los genes de degradación y modificación (betalactamasas) los más abundantes (78.5%). Así mismo, se identificaron dos sistemas de bombeo de eflujo: MdtABC-TolC y AcrAB-TolC y la porina omp36, relacionados también con resistencia a betalactámicos.

En la categoría degradación y modificación la principal metalobetalactamasa encontrada, perteneciente a la clase B de Ambler, fue *bla*NDM-1 con un porcentaje de presencia del 100% en todos los aislados. A nivel mundial el gen *blaNDM*-1 se ha asociado con innumerables bacterias (Wu et al., 2019), en los últimos años y como ya se mencionó reportes en América (Kus et al., 2011) (Carvalho-Assef et al., 2013) (Barrios et al., 2013) (Pasteran et al., 2014) (Carmo Junior et al., 2015) (Zurita et al., 2015), así como informes de países asiáticos (Perry et al., 2011) (Lascols et al., 2011) (Gefen-Halevi et al., 2013) (Tada et al., 2014) (G. Zhou et al., 2014) (Shin et al., 2018) y en Sudáfrica (Tshisevhe et al., 2016), muestran la extensa relación de esta betalactamasa con aislados de *P. rettgeri*. La presencia de NDM-1, ha generado una gran preocupación para la salud pública mundial, debido a que NDM-1 hidroliza una amplia gama de antibióticos betalactámicos, incluidos los carbapenémicos, que son uno de los últimos recursos antibióticos para el tratamiento de infecciones causadas por cepas bacterianas resistentes (Khan, Maryam, & Zarrilli, 2017). El transporte en de este tipo de carbapenemasa, ha hecho que *P. rettgeri* se ubique

dentro del grupo de enterobacterias resistentes a carbapenem (CRE, por sus siglas en inglés) (Robert F. Potter, D'Souza, & Dantas, 2016) (Abdallah & Balshi, 2018); anteriormente *P. rettgeri* era poco asociado a infecciones hospitalarias y no poseía un renombre tan importante en IACS, en la actualidad su ubicación dentro de las CRE lo potencializa como importante problema de salud pública a nivel mundial, ya que las infecciones causadas por CRE tienen una alta tasa de mortalidad con opciones terapéuticas limitadas (PEREZ & VAN DUIN, 2013).

En Colombia, un estudio realizado por el INS (datos no publicados), sitúa en la actualidad a *P. rettgeri* como la segunda enterobacteria del país, portadora del gen *bla*NDM-1. Durante el año 2015 en un estudio reportado por la Secretaria Distrital de salud, *P. rettgeri* era el principal patógeno portador de este gen en Colombia (Secretaría Distrital de Salud & Sub-dirección Vigilancia en Salud Pública, 2015). Con un porcentaje de presencia del 100% de este gen en los aislados de nuestro estudio, se puede confirmar la diseminación de esta metalobetalactamasa en aislados clínicos de *P. rettgeri* colombianos. Además, cabe destacar que un informe presentado en 2017 muestra el papel crucial que tiene *P. rettgeri* como reservorio de *bla*NDM-1 en Colombia y sugiere un modelo para la difusión de *bla*NDM-1 en América Latina, donde *P. rettgeri* desempeña un papel central en este proceso, debido a su alta capacidad de recombinación apoyada por la alta variabilidad de plásmidos encontrada en esta especie (Marquez-Ortiz et al., 2017). En nuestro estudio la presencia de esta metalobetalactamasa potenció la resistencia a todos los carbapenémicos evaluados, observándose porcentajes elevados de resistencia a imipinem (96%), a meropenem (93%) y a ertapenem (68%), como se describió anteriormente.

En la categoría degradación y modificación junto a *bla*NDM-1 otras metalobetalactamasas de la clase B de Ambler fueron descritas pero en menores porcentajes: *bla*VIM-2 (14%) y *bla*VIM-24 en tan solo el (7%). Estos genes, hasta la fecha, no han sido reportados en aislados clínicos de *P. rettgeri*, siendo el presente estudio el primer informe. Es importante resaltar que el gen *bla*VIM-24 se descubrió inicialmente en Colombia en el año 2011, en la ciudad de Barranquilla, siendo aislado de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* (Montealegre et al., 2011); en nuestro estudio, los aislados de *P. rettgeri* con *bla*VIM24 estaban ubicados en el departamento de Risaralda; aunque no se tiene conocimiento de posibles viajes de los pacientes que portaban este gen, no se descarta la posibilidad de que viajes al interior del país estén contribuyendo a la diseminación de determinantes de resistencia. Informes previos indican que la presencia de este tipo de

metalobetalactamasas (*bla*VIM-2, *bla*VIM-24), confieren un mejor poder de resolución a los aislados bacterianos frente a los carbapenémicos (Queenan & Bush, 2007), esto podría indicar que el alto nivel de resistencia a carbapenémicos en nuestro estudio fue posiblemente apoyado por la presencia de estos genes en los aislados de *P. rettgeri*.

De igual modo en la categoría degradación y modificación, otras betalactamasas fueron identificadas por WGS. La principal BLEE encontrada en los aislados de *P. rettgeri* del estudio fue *bla*TEM-1 con un porcentaje de presencia del 61%. Esta betalactamasa se ha convertido en una de las más frecuente entre la familia Enterobacteriaceae (Lachmayr, Kerkhof, DiRienzo, Cavanaugh, & Ford, 2009). Estudios a nivel mundial no mencionan la ubicación de *bla*TEM-1 en *P. rettgeri,* no obstante su presencia en aislamientos colombianos si ha sido descrita (Marquez-Ortiz et al., 2017) (Saavedra-Rojas et al., 2017). La enzima *bla*TEM-1 perteneciente a la clase A de Ambler (serina betalactamasa), hidroliza principalmente las penicilinas y se ha visto asociada con la resistencia a los inhibidores de la betalactamasa (Bush & Jacoby, 2010). Para extender la utilidad de los betalactámicos, algunos se han usado en combinación con inhibidores, por ejemplo la piperacilina se usa en combinación con el inhibidor de la betalactamasa: tazobactam (Schechter et al., 2018). Estos inhibidores clásicos, hacían que la mayoría de los organismos que expresaban serina betalactamasas de clase A fueran sensibles a los betalactámicos. Sin embargo, diversos estudios demuestran que la sobreproducción de *bla*TEM-1 ha dado lugar a la resistencia de inhibidores de betalactamasa (P. J. Wu, Shannon, & Phillips, 1995) (Schechter et al., 2018). Estos datos se correlacionan con los resultados de nuestro trabajo donde apreciamos un porcentaje elevado de aislamientos resistentes (32%) e intermedios (32%) a piperacilina/tazobactam. Con estos resultados podemos apreciar que el objetivo de preservar la utilidad de los betalactámicos, usándolos en combinación con inhibidores de betalactamasa están perdiendo su potencial uso comercial y por tanto su uso en el área clínica para tratar patógenos importantes.

Otras BLEE fueron descritas en aislados de *P. rettgeri*: *bla*CTX-M-12 (47%), *bla*CTX-M-15 (14%) y *bla*PER-4 (4%), estas enzimas pertenecientes a la clase molecular A de Ambler están relacionadas principalmente con resistencia a cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y cefotaxima) (Cantón, González-Alba, & Galán, 2012) (Zhao & Hu, 2013). *bla*CTX-M-15 es la variante más dominante en la familia CTX-M y la más común detectada en todo el mundo en patógenos clínicamente importantes (Zhao & Hu, 2013), esta enzima exhibe eficiencias catalíticas mejoradas contra la ceftazidima (Poirel, Gniadkowski, &

Nordmann, 2002). *bla*CTX-M-12 es la variante descrita principalmente en aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* (Kariuki, Corkill, Revathi, Musoke, & Hart, 2001) (Bae et al., 2006), esta enzima confiere resistencia de alto nivel a la cefotaxima (Bae et al., 2006). La enzima *bla*PER-4 aislada en *Proteus vulgaris* (NG_049963) tiene la capacidad de conferir resistencia a ambas cefalosporinas de tercera generación. La presencia de estas BLEEs en aislamientos de *P. rettgeri* no había sido reportada hasta la fecha, nuestro estudio es el primer informe que asocia la presencia de un número elevado de BLEEs en aislados clínicos de *P. rettgeri*. De las variantes asociadas a CTX-M solo se ha documentado un reporte asociando a *P. rettgeri* con CTX-M-131 (Dropa et al., 2015) y de las variantes encontradas para PER solo hay un reporte asociando a PER-1 en un aislado de *P. rettgeri* de Corea (Shin et al., 2018). La presencia de las enzimas *bla*CTX-M-12, *bla*CTX-M-15 y *bla*PER-4, potencializó la resistencia a todas las cefalosporinas de tercera generación evaluadas, observando porcentajes de resistencia del 100% para ceftazidima y cefotaxima en los aislados de *P. rettgeri* del presente trabajo.

La expresión adicional de la BLEE: *bla*CMY-2, un gen AmpC plasmídico, podría ser responsable de la resistencia de alto nivel expresada a la cefalosporina de segunda generación: cefoxitina en los aislamientos del estudio. Estudios previos indican que el gen *bla*CMY-2 confiere resistencia principalmente a las 7-α-metoxi-cefalosporinas o cefamicinas, como la cefoxitina (Philippon et al., 2002). Reportes del gen *bla*CMY-2, en aislados de *P. rettgeri* no se han reportado en Colombia y siendo este el primer reporte para este patógeno. La expresión de esta enzima se correlaciona con los resultados del estudio los cuales exhibieron un porcentaje de resistencia a cefoxitina del 89%, atribuible probablemente a la expresión de esta betalactamasa. Es importante mencionar el elevado porcentaje de resistencia que expresaron los aislados del estudio a todas las cefalosporinas, donde ningún aislamiento fue sensible para ningún antimicrobiano presente en esta categoría, el estudio genómico por WGS atribuye esta característica probablemente a la expresión de todas las BLEE mencionadas, y también a la expresión simultanea de varias BLEES en un único aislado.

La coexistencia de múltiples betalactamasas en un aislado bacteriano es un gran desafío para la terapéutica clínica, ya que estos aislamientos son variantes extremadamente resistentes a múltiples fármacos (Dhillon & Clark, 2012) (Oteo, Miró, Pérez-Vázquez, & Navarro, 2014) (Blakiston, Heffernan, Roberts, & Freeman, 2017). En todo el mundo, se han publicado pocos informes de *P. rettgeri* que notifican la coexistencia de NDM-1 con

otros determinantes de resistencia. En 2014, se informó la primera coexistencia de metalobetalactamasa NDM-1 junto con la metilasa ARNr ArmA 16S en aislados clínicos de *P. rettgeri* en Nepal (Tada et al., 2014) y recientemente se ha informado, la coexistencia de *bla*NDM-1, junto con otros determinantes de resistencia como β-lactamasas de espectro extendido de tipo PER-1 (ESBL) en Corea (Shin et al., 2018), y betalactamasa de clase D OXA-48, respectivamente, en Turquía (Otlu et al., 2018). Aun así, son pocos los informes de aislamientos de *P. rettgeri* que llevan simultáneamente la metalobetalactamasa NDM-1 junto a múltiples genes asociados con resistencia a antibióticos betalactámicos. En este estudio se describen cuatro importantes coexistencias en aislados de *P. rettgeri,* no descritas en la actualidad: 1) *bla*NDM-1, *bla*TEM-1, *bla*VIM-24 y *bla*OXA-1; 2) *bla*NDM-1 y *bla*PER-4; 3) *bla*NDM-1, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M-12, *bla*CTX-M-15, *bla*VIM-2 y 4) *bla*NDM-1, *bla*CTX-M-15 *bla*VIM-2, *bla*OXA-10 y *bla*CMY-2, los diferentes informes (Tada et al., 2014) (Otlu et al., 2018) (Shin et al., 2018) manifiestan como la presencia de coexistencias en un aislado clínico, aumentan el poder de resolución frente a una gran variedad de antibióticos, este puede ser el motivo de los altos niveles de resistencia expresados tanto a los carbapenémicos como las cefalosporinas en los asilamientos del estudio.

Otro importante mecanismo en *P. rettgeri* asociado con resistencia a antibióticos betalactámicos fueron los sistemas de bombas de eflujo. La principal bomba relacionada con resistencia a betalactámicos fue MdtABC-TolC, con un porcentaje de presencia en aislados de *P. rettgeri* del 100%. Los sistemas transportadores de fármacos de tipo RND son particularmente eficaces para generar resistencia porque forman un complejo tripartito con proteínas periplásmicas y un canal de proteína de membrana externa (Horiyama & Nishino, 2014). El sistema MdtABC-TolC comprende un heteromultímero MdtB / MdtC transmembrana y la proteína de fusión de membrana MdtA (Nagakubo, Nishino, Hirata, & Yamaguchi, 2002). Este sistema de eflujo se ha documentado en *Salmonella entérica* (Nishino, Nikaido, & Yamaguchi, 2007) y *Escherichia coli* (Nagakubo et al., 2002), en *P. rettgeri* solo se había visto asociado en un aislamiento israelí (Olaitan et al., 2015), en nuestro estudio se encuentra presente en la totalidad de los aislados, este resultado indicaría la alta asociación de *P. rettgeri* colombianos con la presencia de esta bomba tripartita. Un estudio realizado por Nagakubo en 2002, muestra como la sobreproducción de un regulador de respuesta BaeR estimula en la bomba MdtABC el fenotipo de resistencia a los fármacos (Nagakubo et al., 2002); este regulador se encontró presente también en el 100% de los aislados de *P. rettgeri* del estudio. La presencia de este

regulador y su posible sobreproducción en los aislados del estudio probablemente favoreció los altos niveles de resistencia expresados contra los carbapenémicos evaluados (imipinem (96%) y meropenem (93%).

Otra bomba en los aislamientos de *P. rettgeri* asociado con resistencia a betalactámicos fue la bomba AcrAB-TolC, presente en el 39% de los aislados. Esta bomba de expulsión es capaz de transportar vectorialmente una amplia gama de compuestos con poca similitud química, lo que confiere resistencia a un amplio espectro de antibióticos (Du et al., 2014), se ha identificado en *Enterobacter cloacae* y en *Escherichia coli* (Pérez et al., 2012) en *P. rettgeri* solo se había documentado en un aislado (Olaitan et al., 2015) la presencia de estos dos sistemas de bombeo (MdtABC-TolC y AcrAB-TolC) en los aislamientos del estudio contribuyó a la resistencia elevada expresada a los antibióticos carbapenémicos.

El último mecanismo encontrado asociado con resistencia a betalactámicos en los aislamientos de *P. rettgeri* del estudio fue la porina: opm36 con un porcentaje de presencia del 72%. Esta porina se ha asociado con resistencia a meropenem principalmente en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (Vedant Vikrom Borah, Arabinda Ghosh, Mohd Shahbaaz, Imtaiyaz Hassan, & Kandarpa K Saikia, 2018). Esta porina nunca se había documentado en aislados de *P. rettgeri*, siendo nuestro estudio el primero en informarlo. Es importante mencionar que los fármacos antimicrobianos primero deben penetrar en la membrana externa para alcanzar sus objetivos, y con los betalactámicos generalmente hidrófilos y cargados, los canales de la porina parecen ser la principal vía de penetración (Sugawara, Kojima, & Nikaido, 2016). Un estudio realizado por Thiolas demostró que una sustitución (Gly112Asp) en la porina omp36 conservada estaba asociada con una alta resistencia a los betalactámicos en aislados de *Enterobacter aerogenes*; esta sustitución permitió una mayor resistencia a los fármacos a través de una alteración funcional de la permeabilidad de la membrana externa asociada con una disminución en la función de la porina que no permitía la entrada del fármaco (Thiolas, Bornet, Davin-Régli, Pagès, & Bollet, 2004). Curiosamente el estudio de WGS permitió determinar la misma sustitución (Gly112Asp) en el 72% de los aislados de *P. rettgeri* del estudio lo que sugiere que la porina omp36 podría estar contribuyendo a la resistencia a betalactámicos principalmente a meropenem por impermeabilidad de su entrada en la bacteria.

Con el fin de discriminar entre aislados de la misma especie, en nuestro caso identificar variantes y determinar distribuciones en función de ellas entre los 28 aislamientos de P.

rettgeri, se empleó el sistema de tipificación de secuencia multilocus ribosomal (rMLST). Este sistema permitió determinar vínculos y relaciones epidemiológicas entre los aislados del estudio. Por primera vez se identificaron 8 rSTs para Providencia rettgeri circulando en el país. Este estudio describe la diseminación de 2 principales rSTs: rST-63073 (45%) y rST-61696 (25%) ambos a nivel intrahospitalario de P. rettgeri NDM: el mayoritario (rST-63073) ocurrido en varias instituciones de la capital (H1 – H6, H8 – H11 y H13) y en un hospital de Cundinamarca - Zipaquirá (H7) y otro rST-61696 ocurrido también en instituciones de la capital (H6, H13) y en un hospital de Santander – Floridablanca (H12). Así mismo se identificaron rSTs circulando de manera única en los departamentos de Valle del cauca (rST-63074), Sucre (rST-63075) y en Risaralda (rST-89603). Esta es la primera vez que se describe la propagación de rSTs de P. rettgeri en varias instituciones del país, estos resultados indican que es necesario establecer una vigilancia epidemiológica y de laboratorio permanente y articulada con el fin de tomar medidas de control adecuadas para prevenir la diseminación de aislamientos con NDM en instituciones de estas áreas geográficas y evitar que se propaguen en todo el país.

Con ayuda de los resultados de WGS, además se determinó la extensa combinación de mecanismos de resistencia asociados a cada uno de estos rSTs. Los resultados permitieron determinar que el rST mayoritario (rST-63073) distribuido por toda la capital, tenía la mayor combinación de mecanismos de resistencia encontrada en el estudio (Figuras 4-17 y 4-18), el resistoma consistió en un total de 34 genes diferentes mediadores de resistencia a antibióticos; este rST poseía 10 genes asociados con resistencia a antibióticos betalactámicos y 24 genes asociados con resistencia a antibióticos no betalactámicos. La combinación de las siete betalactamasas (*bla*NDM-1, *bla*SRT-2, *bla*TEM-1, *bla*CTX-M-12, *bla*CTX-M-15, *bla*VIM-2, *bla*OXA-10), seis bombas de eflujo (MdtABC-TolC, mdtH, EmrAB-TolC, PmrA, AcrAB-TolC, qacH2), ocho genes asociados con degradación y modificación (*aadA1, aadA16, aac(2')-Ia, aac(3)-IIa, aac(3)-IIc, aac(6')-Ian, aph(3')-Ia, aph(3')-Via*), doce genes asociados a cambio del sitio blanco (*gyrB, folP, Sul2, dfrA1, qnrD1, Sul1, gyrA, parC, parE, mfd, dfrA6, dfrA17*) y una porina (omp36), proporcionaron a los trece aislamientos de este rST, una resistencia fenotípica absoluta a un total de diez clases diferentes de antimicrobianos: imipinem, meropenem, ertapenem, cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima, cefepima, piperacilina/tazobactam ciprofloxacina, gentamicina y trimetropin/sulfametoxazol. Estudios previos han demostrado resultados comparables con nuestro estudio donde la combinación de mecanismos como las

betalactamasas, las bombas de eflujo y la presencia de porinas causan altos niveles de resistencia a los antibióticos en diferentes especies bacterianas (Fernández & Hancock, 2012) (Rumbo et al., 2013) (Pagès, Peslier, Keating, Lavigne, & Nichols, 2016).

El otro rST mayoritario, el 61696 fue el segundo rST con mayor combinación de genes asociados con resistencia tanto a betalactámicos como a no betalactámicos. En total poseía una combinación de 30 genes (Figuras 4-17 y 4-18). Su perfil de resistencia también le proporcionó un alto poder de resolución contra ocho clases diferentes de antibióticos (IMI, MEM, ERT, FOX, CAZ, CTX, CIP y SXT. Así mismo los demás rSTs presentaron una gran combinación de genes, pero en menor proporción que los rSTs mayoritarios; los rST-89603, rST-63074, rST-63075, rST-63141 poseían un total de 23 diferentes combinaciones de genes respectivamente, los rSTs 89602 y 89601 presentaron la menor combinación de genes asociadas a resistencia, un total de 16 genes y 14 genes respectivamente (ver figuras 4-17 y 4-18). Aun así con una menor combinación de genes que los rSTs mayoritarios estos aislados también expresaron niveles elevados de resistencia (Tablas 4-1 y 4-2). Esta diversidad genética observada en los *P. rettgeri* del estudio podría deberse a la adquisición de diversos genes de resistencia posiblemente de otras bacterias relacionadas mediante la transferencia horizontal de genes (THG) (Jackson, Vinatzer, Arnold, Dorus, & Murillo, 2011). THG ha seguido siendo el principal impulsor de la evolución bacteriana al permitir que las bacterias adquieran rápidamente nuevos rasgos de resistencia con la ayuda de elementos genéticos móviles (EGMs) (Rankin, Rocha, & Brown, 2011). Los encuentros repetidos de patógenos con otros microbios en un huésped o en el medio ambiente proporcionan una plataforma para el intercambio y la adquisición de estos EGMs (Jackson et al., 2011) siendo estos procesos biológicos los que contribuyen a la expansión de determinantes de resistencia entre bacterias y por tanto al aumento de patógenos difíciles de controlar, como el caso de *P. rettgeri* MDR.

Para tener un punto de comparación con respecto a la tipificación obtenida por rMLST, exploramos la secuenciación de genoma completo (WGS) como un enfoque alternativo para la tipificación de cepas bacterianas; para ello se construyó un árbol filogenético con Roary a partir de la ausencia / presencia de los genes central y accesorio (pangenoma) (Figura 4-19). Como resultado de la comparación entre las metodologías, se encontró una mejor resolución y una capacidad discriminatoria mayor, entre las cepas del estudio, con el conjunto de genes completos (pangenoma) que a partir de la alelización con los 53 genes del ribosoma bacteriano. Podemos observar que el rST mayoritario (rST-63073) que

comprendía la totalidad de 13 aislamientos, fue dividido en 4 clados diferentes (F, G, H, I) y a su vez el clado I se subdivido en los subclados (I1, I2 I3), estos resultados evidencian como WGS ofreció una resolución superior discriminando mejor los tipos de cepas. Diferentes estudios demuestran que esta metodología es menos propensa a dar resultados falsos positivos y falsos negativos. Además, las diferencias genómicas que distinguen las cepas se pueden medir con precisión y son altamente reproducibles, lo que permite una inferencia de alta resolución de las relaciones filogenéticas (Salipante et al., 2015).

Así mismo la tipificación a partir de WGS en nuestro estudio, al lograr un poder discriminatorio más alto que rMLST, pudo determinar mejores diferencias entre los aislados: la distribución en el árbol filogenético logró establecer que los aislados de *P. rettgeri* del estudio se agruparon jerárquicamente según los resultados de la matriz de los genes central y accesorio, formando grupos que contenían aislados de diversos hospitales, sus distancias indicaron que la mayoría de aislamientos de *P. rettgeri* no eran clonales y el árbol filogenético indico la amplia dispersión de las cepas de *P. rettgeri* en Colombia (Figura 4-19). Así mismo se logró determinar la clonalidad de los aislados GMR-RA257 y GMR-RA1153 ubicados en Bogotá en un hospital al sur de la ciudad (H11) y la clonalidad de los aislados GMR-RA649 y GMR-RA767 ubicados en sitios geográficos diferentes del país: Bogotá y Risaralda. Estos resultados se correlacionan con estudios posteriores (SenGupta et al., 2014) (Fitzpatrick, Ozer, & Hauser, 2016) (Schürch, Arredondo-Alonso, Willems, & Goering, 2018) que muestran como WGS proporciona una resolución sin precedentes para discriminar incluso los linajes de bacterias altamente relacionadas e incluso como el análisis de todo el genoma podría revolucionar el análisis de brotes en los hospitales.

Se realizó la construcción de un árbol filogenético también a partir del pangenoma para determinar la diversidad y las relaciones filogenéticas de los genomas 28 genomas de *P. rettgeri de*l estudio con 16 genomas de *P. rettgeri* informados previamente en la base de datos del GenBank. Se determinó a través del árbol filogenético y las distancias entre todos los genomas de *P. rettgeri* la extensa dispersión de las cepas de *P. rettgeri* en diversos partes del mundo (Figura 4-20). El estudio no mostró el predominio de algún clon internacional, sin embargo se lograron identificar relaciones genómicas de interés entre los genomas colombianos y genomas de otros países. Dentro del segundo rST mayoritario se observan cuatro aislamientos: GMR-RA1151, GMR-RA38516, GMR-RA1153 y GMR-RA257, que fueron recolectados de la misma institución hospitalaria, podemos observar

en la figura 4-20 que estos cuatro aislamientos compartían el mismo rST y estaban ubicados dentro del mismo clado en el árbol filogenético, estos resultados indican la circulación de aislamientos de *P. rettgeri* estrechamente relacionados en esa institución hospitalaria (H11) ubicada al sur de Bogotá. Así mismo otro resultado interesante muestra la relación clonal entre los aislados GMR-RA1153 y GMR-RA257 de esa institución, aislamientos que fueron recolectados en los meses de marzo y diciembre respectivamente, estos resultados podrían indicar la circulación de un clon a nivel intrahospitalario en este hospital durante un periodo de tiempo prolongado. Así mismo, los cuatro genomas descritos anteriormente están muy relacionados con el genoma colombiano RB151 reportado en Bucaramanga, Colombia, durante el año 2013 (R. Alejandro Marquez-Ortiz et al., 2017). Esto indicaría la presencia del rST-61696 en dos ubicaciones geográficas diferentes del país y la posible circulación más amplia de este rST en Colombia desde el año 2013. Así mismo, si observamos en el árbol filogenético (Figura 4-20) el aislamiento FDAARGOS_330 recogido en 2015, en un Hospital Nacional de Niños en EE. UU., muestra también una estrecha relación con estos cuatro genomas y se tipificó igualmente como rST-61696, lo que sugiere una circulación más amplia de este rST en el mundo.

De igual manera cuando observamos el rST-89603 para los aislados GMR-RA42816 y GMR-RA46616, podemos observar que se encuentran relacionados con genomas de EE.UU. obtenidos de fuentes no humanas: UBA5024 de metal/plástico y Dmel1 de Hemolinfa de *Drosophila melanogaster*, estos resultados indicarían la diseminación *de P. rettgeri* a focos ambientales. La colonización de fuentes ambientales potencializa la trasmisión de patógenos como *P. rettgeri* NDM-1 a fuentes extra hospitalarias, convirtiéndose en reservorios para estos patógenos, lo que agrava la situación de la diseminación de la resistencia, debido a que la transmisión de estas bacterias a personas de la comunidad, sería incluso, sin un contacto hospitalario. El estudio por WGS permitió además, descubrir la presencia de diversos rSTs circulando en otros países: tres rST circulando en Estados Unidos: rST-37417, rST-37410, rST-63059, uno en Sudáfrica: rST-63070, uno en Brasil: rST-37423, y un rST en Israel: rST-37424. Nuestro trabajo es el primer informe que da una idea inicial de la circulación de rSTs en varias regiones del mundo, sin embargo se necesita más investigación para poder definir la presencia de complejos clonales internacionales. Es importante mencionar que el rST de los genomas de referencia (MR4, 729-12, UBA5024, AR_0082, TUM9994 y Pret_2032) y las cepas de colección (NCTC11801 y, NCTC7476) no pudieron definirse debido a que las secuencias

de nucleótidos de los diferentes loci (genes rps, rpl, rpm) aún no han sido asignados a los tipos rST en la base de datos rMLST, por lo que es necesario realizar esta definición en futuras investigaciones.

La implementación de WGS para la vigilancia de enterobacterias ha revolucionado el trabajo de los laboratorios de salud pública y de la microbiología, ya que permite inferir una multitud de características en los microorganismos en una única secuenciación, que tradicionalmente requeriría una serie de pruebas de laboratorio independientes. Un ejemplo destacado del valor agregado proporcionado por WGS es la generación de perfiles resistencia antimicrobiana (RAM) a partir de las secuencias en tiempo real (Neuert et al., 2018).

WGS ha demostrado ser exitoso en la predicción de perfiles de resistencia antimicrobiana en una gran variedad de patógenos, entre ellos *Escherichia coli* (Stoesser et al., 2013) (Tyson et al., 2015) (Do Nascimento et al., 2017), *Klebsiella pneumoniae* (Stoesser et al., 2013), *Shigella sonnei* (Sadouki et al., 2017), y *Salmonella enterica serovars Typhi and Paratyphi* (Day et al., 2018), Por ejemplo, Neuert y colaboradores analizaron 3491 aislamientos de *Salmonella enterica* para comparar los perfiles genotípicos inferidos con las susceptibilidades fenotípicas para diferentes antimicrobianos, encontrando una concordancia del 99.74% entre las susceptibilidades fenotípicas y los genes de resistencia predichos por WGS (Neuert et al., 2018). Al igual que un estudio realizado en Inglaterra donde se proporcionó evidencia de un alto nivel de concordancia (98.4%) entre los perfiles fenotípicos y genotípicos de RAM (Do Nascimento et al., 2017). Este número creciente de estudios ha demostrado una buena correlación entre los perfiles fenotípicos y genotípicos de RAM, y nuestro estudio proporciona evidencia adicional de un alto nivel de concordancia (96.4%) para predecir resistencia a antibióticos betalactámicos entre los dos enfoques. En nuestro trabajo, el desajuste a antibióticos betalactámicos (1 de 28) fue en un aislado que se presumía a partir de los datos derivados del genoma, genotípicamente resistente a un antimicrobiano específico pero se encontraba fenotípicamente susceptible al antimicrobiano relevante, lo que indica que los determinantes de RAM estaban presentes pero no se expresaron o se expresó pobremente.

Para el aislamiento discrepante, el resultado por Kirby Bauer mostró sensibilidad a los carbapenémicos MEM y ERT, aun albergando en su genoma el gen *bla*NDM-1. La falta de coincidencia no se pudo identificar a partir de los datos de WGS, sin embargo la variación

técnica tolerada que es inherente al método de difusión pudo determinarse como una posible causa (Sadouki et al., 2017); el empleo de otra técnica de tipificación de resistencia como la basada en métodos automatizados, podrían dar un resultado basado en la concentración Mínima Inhibidora (MIC) y dar una mejor correlación genotipo-fenotipo. Además de ser un posible inconveniente del método de tipificación de resistencia, los genes de resistencia silenciosa han sido descritos previamente (Enne, Delsol, Roe, & Bennett, 2006). Enne y colaboradores demostraron en un estudio el silenciamiento de los genes de resistencia *bla*(OXA-2), *aadA1, sul1* y *tetA* transportados en plásmidos de *Escherichia coli;* en la mayoría de los casos se encontró que las secuencias codificantes y las regiones promotoras de estos genes estaban intactas, pero no se transcribieron. Dicho silenciamiento génico indicó una forma de control transcripcional no reconocida previamente que anula las señales de expresión estándar para desactivar la expresión génica. Estos hallazgos sugieren que los genes de resistencia no expresados pueden ocurrir en la naturaleza y, por lo tanto, pueden tener implicaciones clínicas.

La susceptibilidad a piperacilina/tazobactam fue variable, algunos aislados fueron susceptibles aun conteniendo el gen *bla*TEM-1. La resistencia a TZP por el gen *bla*TEM-1 está bien documentada y está asociada principalmente a una mutación Pa / Pb en el promotor *bla*TEM-1 que aumenta la transcripción y por tanto la hiperproducción del gen *bla*TEM-1 (K. Zhou, Tao, Han, Ni, & Sun, 2019) probablemente algunos de los aislamientos sensibles no expresaban en sus genes *bla*TEM-1 la mutación mencionada, así mismo el perfil genotípico a partir de WGS no evidencia la presencia de otros genes específicos para la resistencia de TZP como OXY-2 (Sato et al., 2015).

En cuanto a la predicción de resistencia a antibióticos No betalactámicos observamos un alto nivel de concordancia para los antibióticos de las categorías fluoroquinolonas (96.8%) y sulfonamidas-diaminopirimidinas (92.8%), la concordancia a aminoglucósidos fue la más afectada (67.8%), nueve aislamientos que tenían variantes *aadA, aac, aph* y *ant*, que se predecían para conferir resistencia a los aminoglucósidos (amikacina y gentamicina) se informaron como sensibles fenotípicamente. Se ha demostrado previamente que las variantes de aadA se encuentran en integrones y cuanto más lejos el casete del gen aadA se encuentra del promotor menor es la expresión (Lévesque, Piché, Larose, & Roy, 1995) (Zankari et al., 2013). Así mismo otros genes, como las variantes aac (6 '), normalmente son silenciosos y solo se vuelven transcripcionalmente activos en casos raros (Magnet, Courvalin, & Lambert, 1999). Tyson propone que la presencia de estos genes debería

usarse como un indicador del potencial de resistencia y esto puede presentar una alternativa razonable a las pruebas fenotípicas convencionales (Tyson et al., 2015).

Para el aislamiento discrepante asociado con fluoroquinolonas el resultado fenotípicamente mostró sensibilidad a la ciprofloxacina aun albergando en su genoma genes asociados a su resistencia: *gyrA* y *parC*. Se ha indicado previamente que las mutaciones *gyrA* en combinación con *parC* se requerían para la resistencia a la ciprofloxacina (Ruiz et al., 1997), como lo evidenciado en el estudio de Sadouki donde la resistencia a ciprofloxacina fue conferida por mutaciones triples en gyrA y parC (Sadouki et al., 2017) posiblemente mutaciones en estos genes no se evidenciaron en el aislado que presentó la discrepancia. Este resultado también sugiere la actualización regular de las base de datos de resistencia para incluir nuevos genes y mutaciones de RAM, para que los perfiles de resistencia derivados de los datos de WGS siga siendo alta.

La obtención de perfiles RAM a partir de datos del genoma en el estudio demostró ser un enfoque robusto y preciso para *P. rettgeri*. Los datos de WGS para determinar la RAM requieren un análisis cuidadoso, ya que los resultados pueden ser difíciles de interpretar en términos de expresión fenotípica. Si bien no se identificaron ejemplos de aislamientos genotípicamente susceptibles / fenotípicamente resistentes en nuestro trabajo, existe el riesgo de perder un mecanismo de resistencia que no se incluye actualmente en la base de datos de referencia, lo que daría como resultado la predicción de susceptibilidad en un aislado resistente, un error muy importante si se necesita tratamiento. Por tanto, los avances en la búsqueda de nuevas plataformas de secuenciación más baratas y asequibles deben ir combinadas con la actualización regular de las base de datos de resistencia, todo con el fin de hacer de la secuenciación de genoma completo la herramienta estándar en microbiología a futuro, la cual pueda proporcionar un perfil genómico del paciente en pocas horas permitiendo tratamiento efectivo y personalizado, que a largo evitará la resistencia a los antimicrobianos.

Actualmente, la evidencia publicada respalda el uso de perfiles de RAM inferidos por WGS para guiar la toma de decisiones clínicas, y en la actualidad WGS está revolucionando las pruebas fenotípicas con fines de vigilancia (Ellington et al., 2017). Estudios a nivel mundial comparan perfiles de RAM fenotípicos y derivados del genoma los cuales muestran una buena correlación y arrojan evidencia sobre las razones de algunos resultados discrepantes observados (Zankari et al., 2013). Con respecto al pequeño número de

perfiles fenotípicos discordantes y RAM derivados del genoma en nuestro trabajo, una mejor comprensión del papel de las variantes alélicas, las combinaciones de genes específicos y los mecanismos promotores / atenuadores en la manifestación fenotípica mejorará aún más la solidez de los datos genómicos para la vigilancia y, en definitiva, mejorar los resultados para el ámbito clínico.

6. Conclusiones

Los aislamientos de *P. rettgeri bla*NDM-1 analizados en este estudio durante el periodo 2015-2016 fueron recolectados principalmente de muestras de orina (82,1%), ciudad de Bogotá (75%) y pacientes masculinos (95%) y presentaron patrones extensos de resistencia principalmente a los carbapenémicos, cefalosporinas, sulfonamidas y fluoroquinolonas.

Los análisis comparativos de fenotipificación mediante rMLST y Pangenoma permitieron la agrupación jerárquica de los 28 genomas de *P. rettgeri* en 8 rSTs y 10 clados, mostrando una ampliación distribución en Colombia. Los rST-63073 (45%) y rST-61696 (25%), fueron los rSTs intrahospitalarios mayoritarios distribuidos principalmente en la ciudad de Bogotá.

Los análisis de los perfiles genómicos de resistencia antimicrobiana para los 28 genomas *P. rettgeri* permitieron identificar 116 genes mediadores de resistencia tanto para antibióticos betalactámicos como no betalactámicos para los cuatro mecanismos reportados hasta la fecha: degradación y modificación, bombas de eflujo, porinas y cambio del sitio blanco. Así como tres coproducciones nuevas (*bla*NDM-1 y *bla*VIM-2; *bla*NDM-1 y *bla*VIM-24; y *bla*NDM-1, *bla*VIM-2, *bla*CTX-M-15, *bla*CMY-2, *bla*TEM-1 y *bla*OXA10) no reportadas anteriormente.

Los perfiles genómicos de resistencia generados en este estudio mostraron una alta concordancia con los perfiles fenotipos de resistencia para antibióticos betalactámicos (96.4%) y no betalactámicos (96.8%), sugiriendo la utilidad de esta herramienta en la caracterización del resistoma en aislamientos clínicos permitiendo el diagnóstico y tratamiento diferencial de los pacientes.

Todo nuestro trabajo permitió ver la utilidad de WGS como herramienta de tipificación, diagnóstico y discriminación de perfiles de RAM, así como su uso potencial como herramienta para predecir perfiles fenotípicos de resistencia. La aplicación de la secuenciación del genoma completo, como método de diagnóstico está siendo estudiada en diferentes países, y los últimos estudios lo potencian como herramienta Gold estándar en la práctica microbiológica del futuro. La adaptación de esta herramienta como metodología de rutina en laboratorios de salud pública y en algunos laboratorios clínicos del mundo podría ser una iniciativa para ser usada como una metodología alternativa en Colombia en un futuro próximo, esto permitiría una identificación más específica de los patrones de resistencia y por lo tanto aportaría a la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos multirresistentes.

7. Recomendaciones

Para posteriores estudios se hace necesario la inclusión de un número mayor de aislamientos de *P. rettgeri* obtenidos de otros departamentos colombianos y de varias instituciones hospitalarias, con el fin de tener una visión del estudio mucho más amplia, detallada y completa de la situación nacional en cuanto a aislamientos de *P. rettgeri* NDM-1 causantes de infecciones asociadas a la atención en salud (IACS).

Realizar el análisis genómico considerando la identificación de plásmidos; debido a que los genes asociados con resistencia bacteriana pueden estar codificados tanto a nivel cromosómico como a nivel plasmídico. La separación de los genes de resistencia por su naturaleza, puede proporcionar una comprensión más amplia de la diseminación de los elementos genómicos que median la resistencia a antibióticos betalactámicos como a no betalactámicos en los aislamientos de *P. rettgeri.*

A. Anexo: Procedimientos

1. Extracción de ADN genómico.

**QIAamp® DNA mini kit (Qiagen)

Se partió de un caldo LB de 10ml el cual fue inoculado con colonias bacterianas y cultivado por 4 horas a 37°C en constante agitación (200 rpm). Esta muestra se pasó a un tubo Falcon (previamente pesado) y se centrifugó 10 min a 7500 rpm, eliminando el sobrenadante, una vez obtenido el pellet se lavó con 2000 µL de buffer TE (10mM Tris-HCl - 5mM EDTA) y se centrifugó nuevamente 10 min a 7500 rpm, se descartó el sobrenadante y la lisis celular fue realizada con el pellet obtenido. Para la lisis, los volúmenes adicionados de cada reactivo fueron calculados según el peso de la biomasa. Primero se adicionó el buffer ATL y la proteinasa K, los cuales se mezclaron con el pellet y se dejaron incubando a 37°C con una agitación de 80 rpm (el tiempo de incubación dependió de la obtención de una lisis transparente). Una vez el pellet estuvo transparente se adicionó RNasa y se incubó a 37°C por 1 hora. Posteriormente, se adicionó el buffer AL (guanidina) y se incuba a 70°C por 10 min. Para terminar la lisis se adicionó etanol absoluto atemperado. A continuación, se adicionó el contenido de la lisis a una columna y se centrifugó por 5 min a 15,000 rpm, se transfirió la columna a un nuevo tubo de 2ml y se adicionó 500ul de solución buffer AW1 (isopropanol) se centrifugó 5min por 15,000 rpm, y se adicionó 500ul de buffer AW2 (etanol) centrifugándose nuevamente 5min a 15,000 rpm, finalmente se centrifugó la columna vacía por 5 min a 15,000 rpm y se adicionó 100µL de agua estéril, centrifugándose 5min a 15000 rpm.

**PureLink® Genomic DNA Kit (Thermo Fisher Scientific / Invitrogen)

Para realizar la lisis se resuspendió el pellet obtenido en 180 µL del buffer de digestión genómica y se añadió 20 µL de proteinasa K para lisar las células, esta mezcla se incubó en baño serológico a 55 °C hasta que se obtuvo una suspensión transparente (aproximadamente 1 hora de incubación). Posteriormente, se agregó 20 µL de RNasa A al lisado y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos, luego se adicionó 200 µL del Buffer Lysis / Binding y al final se adicionó 200 µL de etanol absoluto. A continuación, se adicionó el contenido de la lisis a una columna y se centrifugo por 1 min a 15,000 rpm, la columna se pasó a un tubo nuevo de 2ml y se agregó 500 µL del buffer de lavado (etanol) y se centrifugo 3 min a 15,000 rpm, posteriormente se procedió a la elución del ADN, centrifugando primero la columna vacía 1min a 15,000 rpm y luego adicionando 100 µL de agua estéril centrifugando nuevamente 1min a 15,000 rpm.

2. Purificación de productos de PCR con Acetato de Sodio.

Al producto de PCR se le adicionó 1/10 de acetato de sodio a una concentración 3 M y a un PH de 5.2. A continuación se le adicionó 2,5 veces de Etanol frio al 100%, la solución se dejó precipitando a -80°C por una hora, trascurrido el tiempo la solución se centrifugó a 13000 rpm, por 30 mins a 4°C y se descartó el sobrenadante. Después se lavó el precipitado con etanol al 80% frío y se centrifugó a 13000 rpm, por 15 mins a 4°C y se descartó el sobrenadante. Finalmente se repitió un segundo lavado con etanol al 80% frío, se descartó el sobrenadante, se dejó secar por una hora y el ADN se eluyó con 50 µl de agua estéril libre de DNasas.

3. Evaluación de la susceptibilidad de los aislamientos de *P. rettgeri* por la metodología Kirby Bauer.

Para la susceptibilidad se sirvieron 4 ml de solución salina estéril en tubos de ensayo, con la ayuda de un hisopo estéril, se tomaron de 2 a 3 colonias de cada uno de los aislamientos sembrados con anterioridad en agar sangre o en agar MacConkey y se suspendieron en el tubo hasta alcanzar una absorbancia de 0.08 – 0.10 a 625 nm en el espectrofotómetro, una turbidez comparable a la Escala de Mc Farland 0.5. Una vez preparado el inóculo bacteriano y no mayor a 15 mins, se escurrió el hisopo sobre las paredes del mismo tubo para retirar el exceso de líquido, se sembró el inóculo en placas de agar Mueller Hinton con estrías paralelas y compactas en toda la superficie del cultivo, luego se repitió el

procedimiento de sembrado rotando la placa 60° en dos oportunidades más para obtener un crecimiento confluente.

A continuación se dejó secar la placa de 3 a 5 mins y se colocaron los discos con el antibiótico a evaluar con pinzas estériles, para las placas de 100 mm se pusieron hasta 5 discos y para las placas de 150 mm se pusieron solo hasta 10 discos. Luego de haber puesto los discos, las placas fueron incubadas a 35°C ± 2°C de 20 a 24 horas. Paralelo a la siembra de los aislamientos en estudio, se sembraron de la misma forma las cepas de control: *Pseudomona aeruginosa* ATCC® 27853 y *Escherichia coli* ATCC® 35218 (para Betalactámicos/combinaciones de inhibidores β-lactamasas), sugeridas por el CLSI como cepas de control de calidad, a las cuales se les conoce sus patrones de sensibilidad y que se usan para garantizar la fiabilidad de la metodología. A las 24 horas, se realizó la medición de los halos de inhibición, corroborando primero que las cepas ATCC se encontraban en los rangos establecidos. Las categorías resistente, intermedio y sensible fueron obtenidas por las tablas de interpretación establecidas por el (CLSI, 2015).

4. Detección fenotípica de carbapenemasas.

Test de Hodge Modificado (THM)

Se preparó una suspensión bacteriana con la cepa control con solución salina ajustando la turbidez a un patrón 0,5 de la escala de turbidez de McFarland, esta suspensión se inoculó en una placa de agar Mueller - Hinton. A continuación, se colocó un disco de imipenem (10 µg) en el centro y se realizaron estrías con un asa de siembra desde el centro hacia los extremos de la placa tanto con la cepa control (Escherichia coli ATCC 259229) como con los aislamientos del estudio. Se incubó a 37 ºC durante 24 horas. Se consideró un test positivo, es decir, presencia de carbapenemasa, cuando el halo de la *E. coli* control ATCC 259229 se distorsionó debajo de las estrías realizadas con los aislamientos del estudio.

Prueba de sinergia de doble disco (ácido etilendiaminotetraacético/ácido mercaptoacético [EDTA/SMA])

Esta prueba se utilizó para la detección fenotípica de las carbapenemasas de la clase B, es decir, de enzimas metalobetalactamasas. Cada aislamiento del estudio se inoculó en

una placa de agar Mueller - Hinton con una dilución en solución salina hasta conseguir una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland. A continuación, se colocaron 2 discos de imipenem. Se añadieron 10 µl de EDTA 0,1 M a uno de los discos de imipenem. Se incubó a 37ºC durante 24 horas. Se consideró positivo, es decir, presencia de metalobetalactamasa, cuando el halo del disco de imipenem/EDTA fue al menos 5 mm mayor que el halo del disco de imipenem.

Prueba de sinergia ácido fenil borónico [APB]

Esta prueba se utilizó para la detección fenotípica de las carbapenemasas de la clase A. Cada aislamiento del estudio se inoculó en una placa de agar Mueller-Hinton con una dilución en solución salina hasta conseguir una turbidez de 0,5 en la escala de McFarland. A continuación, se colocaron 2 discos de meropenem (10 µg). Se añadieron 10 µl de APB (40 µg/µl) a uno de los discos de meropenem. Se incubó a 37ºC durante 24 horas. Se consideró positivo, es decir, presencia de carbapenemasa de la clase A cuando el halo del disco de meropenem/PBA fue al menos 5 mm mayor que los halos de los discos de meropenem y meropenem/cloxacilina.

B. Anexo: Scripts

Script 1. Construcción de la matriz de resistencia.

El script se encuentra en el servidor de bioinformática, cuya dirección IP es 168.176.54.15. En la carpeta /vault2/homehpc/lapizab.

C. Anexo: Tablas

1. Evaluación de la secuenciación de 16s rRNA en aislamientos de *P. rettgeri.*

Aislamiento	Hit secuenciación de 16S	Max score	Query cover	E value	Ident
GMR-RA 14	*P. rettgeri* strain SH10 16S ribosomal RNA gene	1735	100%	0.0	100%
GMR-RA 15	*P. rettgeri* strain ALK310 16S ribosomal RNA gene	1733	99%	0.0	99%
GMR-RA 43	*P. rettgeri* strain RCB200 16S ribosomal RNA gene	1729	100%	0.0	100%
GMR-RA 180	*P. rettgeri* strain ALK417 16S ribosomal RNA gene	1729	100%	0.0	100%
GMR-RA 181	*P. rettgeri* strain CD256 16S ribosomal RNA gene	1729	100%	0.0	100%
GMR-RA 218	*P. rettgeri* strain ALK516 16S ribosomal RNA gene	1727	99%	0.0	99%
GMR-RA 257	*P. rettgeri* strain ALK045 16S ribosomal RNA gene	1727	100%	0.0	100%
GMR-RA 278	*P. rettgeri* strain SH10 16S ribosomal RNA gene	1735	100%	0.0	100%
GMR-RA 437	*P. rettgeri* strain SH10 16S ribosomal RNA gene	1735	100%	0.0	100%
GMR-RA 454	*P. rettgeri* strain OK-62 NRB16S ribosomal RNA gene	1724	99%	0.0	99%
GMR-RA 555	*P. rettgeri* strain SNCO1 1A 16S ribosomal RNA gene	1724	100%	0.0	100%
GMR-RA 649	*P. rettgeri* strain GZLB11 16S ribosomal RNA gene	1724	100%	0.0	100%
GMR-RA 767	*P. rettgeri* strain GZLB11 16S ribosomal RNA gene	1724	100%	0.0	100%
GMR-RA 951	*P. rettgeri* strain RCB200 16S ribosomal RNA gene	1729	100%	0.0	100%
GMR-RA 953	*P. rettgeri* strain SH10 16S ribosomal RNA gene	1735	100%	0.0	100%
GMR-RA 1048	*P. rettgeri* strain SH10 16S ribosomal RNA gene	1735	100%	0.0	100%
GMR-RA 1080	*P. rettgeri* strain ALK417 16S ribosomal RNA gene	1729	100%	0.0	100%
GMR-RA 1151	*P. rettgeri* strain SH10 16S ribosomal RNA gene	1735	100%	0.0	100%
GMR-RA 1152	*P. rettgeri* strain CD256 16S ribosomal RNA gene	1729	100%	0.0	100%
GMR-RA 1153	*P. rettgeri* strain ALK045 16S ribosomal RNA gene	1727	100%	0.0	100%
GMR-RA 77.16	*P. rettgeri* strain CD256 16S ribosomal RNA gene	1729	100%	0.0	100%
GMR-RA 136.16	*P. rettgeri* strain SH10 16S ribosomal RNA gene	1735	100%	0.0	100%
GMR-RA 222.16	*P. rettgeri* strain ALK310 16S ribosomal RNA gene	1733	99%	0.0	99%
GMR-RA 385.16	*P. rettgeri* strain IR14 16S ribosomal RNA gene	1724	99%	0.0	99%
GMR-RA 428.16	*P. rettgeri* strain ALK045 16S ribosomal RNA gene	1727	100%	0.0	100%
GMR-RA 438.16	*P. rettgeri* strain RCB200 16S ribosomal RNA gene	1729	100%	0.0	100%
GMR-RA 445.16	*P. rettgeri* strain SH10 16S ribosomal RNA gene	1735	100%	0.0	100%
GMR-RA 466.16	*P. rettgeri* strain ALK045 16S ribosomal RNA gene	1727	100%	0.0	100%

2. Características del ensamblaje y anotación de genomas colombianos de *P. rettgeri.*

Aislamiento	Contigs	Profundidad	Tamaño del genoma	GC (%)	N50	CDs	rRNAs	tRNAs	Genes predichos
GMR-RA 14	74	227x	4586492	40,88	231224	4173	8	73	4255
GMR-RA 15	105	201x	4865229	40,51	207574	4517	5	69	4592
GMR-RA 43	100	185x	4947049	40,63	225819	4622	7	68	4698
GMR-RA 180	91	237x	4827806	40,56	207574	4459	6	68	4534
GMR-RA 181	107	184x	4924365	40,55	207574	4587	7	69	4664
GMR-RA 218	124	143x	4781021	40,53	217477	4408	5	71	4485
GMR-RA 257	158	744x	4836247	40,50	187362	4451	7	71	4523
GMR-RA 278	309	711x	4767010	40,41	225804	4404	7	71	4476
GMR-RA 437	145	777x	4825425	40,43	209597	4464	7	71	4536
GMR-RA 454	108	707x	4904242	40,52	207574	4697	10	75	4697
GMR-RA 555	138	870x	5055909	40,67	203892	4739	10	69	4809
GMR-RA 649	90	767x	4567222	40,72	235083	4211	8	69	4281
GMR-RA 767	80	918x	4586276	40,70	273263	4230	8	70	4301
GMR-RA 951	102	138x	4878737	40,51	232085	4499	7	68	4575
GMR-RA 953	118	144x	4964785	40,61	190692	4634	4	69	4708
GMR-RA 1048	118	615x	4944815	40,64	207563	4618	10	69	4688
GMR-RA 1080	114	183x	4962333	40,58	204025	4631	6	69	4707
GMR-RA 1151	162	785x	4815293	40,59	193663	4420	7	71	4492
GMR-RA 1152	122	612x	4780475	40,51	225819	4422	10	68	4491
GMR-RA 1153	152	216x	4838047	40,50	223809	4452	7	71	4523
GMR-RA 77.16	120	622x	4996167	40,63	200281	4646	10	68	4715
GMR-RA 136.16	85	192x	4672155	40,34	258026	4314	9	70	4394
GMR-RA 222.16	111	164x	5041616	40,64	231084	4688	6	68	4763
GMR-RA 385.16	128	724x	4837031	40,61	237364	4452	6	71	4524
GMR-RA 428.16	88	756x	4560478	40,63	297857	4233	5	71	4305
GMR-RA 438.16	132	776x	4726881	40,07	209596	4335	9	70	4406
GMR-RA 445.16	102	872x	4691894	40,41	225804	4307	7	71	4379
GMR-RA 466.16	117	821x	4570290	40,66	395193	4242	5	71	4314

Bibliografía

Abdallah, M., & Balshi, A. (2018). First literature review of carbapenem-resistant Providencia. *New Microbes and New Infections*, *25*, 16-23. https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.05.009

Abraham, E. P., & Chain, E. (1988). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Reviews of Infectious Diseases*, *10*(4), 677-678.

Adedeji, W. A. (2016). THE TREASURE CALLED ANTIBIOTICS. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*, *14*(2), 56-57.

Alikhan, N.-F., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L., & Beatson, S. A. (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): Simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*, *12*, 402. https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402

Al-Jubouri, M., & Vardhan, M. (2001). A case of purple urine bag syndrome associated with Providencia rettgeri. *Journal of Clinical Pathology*, *54*(5), 412. https://doi.org/10.1136/jcp.54.5.412-a

Andam, C. P., Fournier, G. P., & Gogarten, J. P. (2011). Multilevel populations and the evolution of antibiotic resistance through horizontal gene transfer. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(5), 756-767. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00274.x

Andrews, S. (2013). FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Recuperado 13 de septiembre de 2018, de Http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/ website: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C. H., Barker, W. C., Boeckmann, B., Ferro, S., … Yeh, L.-S. L. (2004). UniProt: The Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, *32*(Database issue), D115-D119. https://doi.org/10.1093/nar/gkh131

Bae, I. K., Lee, Y.-N., Hwang, H. Y., Jeong, S. H., Lee, S. J., Kwak, H.-S., … Youn, H. (2006). Emergence of CTX-M-12 extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in Korea. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(6), 1257-1259. https://doi.org/10.1093/jac/dkl397

Bahar, G., Eraç, B., Mert, A., & Gülay, Z. (2004). PER-1 production in a urinary isolate of Providencia rettgeri. *Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)*, *16*(4), 343-346. https://doi.org/10.1179/joc.2004.16.4.343

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., … Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology: A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, *19*(5), 455-477. https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021

Barrios, H., Garza-Ramos, U., Reyna-Flores, F., Sanchez-Perez, A., Rojas-Moreno, T., Garza-Gonzalez, E., … Silva-Sanchez, J. (2013). Isolation of carbapenem-resistant NDM-1-positive Providencia rettgeri in Mexico. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*(8), 1934-1936. https://doi.org/10.1093/jac/dkt124

Belkum, A. van, Tassios, P. T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N. K., … Struelens, M. (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, *13*, 1-46. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01786.x

Bhadania, R. A., Golakiya, B. A., Akbari, D. L., Parakhia, M. V., & Bhalani, H. N. (2015, septiembre 1). Draft genome sequence of the endophytic bacterium Providencia rettgeri MR4 isolated from Abuliton indicum—A salt tolerant plant. Recuperado 23 de noviembre de 2018, de Journal of Pure and Applied Microbiology website: http://link.galegroup.com/apps/doc/A436439755/AONE?sid=googlescholar

Blakiston, M., Heffernan, H., Roberts, S., & Freeman, J. (2017). The clear and present danger of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) in New Zealand: Time for a national response plan. *The New Zealand Medical Journal*, *130*(1454), 72-79.

Blázquez, J., Oliver, A., & Gómez-Gómez, J.-M. (2002). Mutation and evolution of antibiotic resistance: Antibiotics as promoters of antibiotic resistance? *Current Drug Targets*, *3*(4), 345-349.

Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Bacterial identification methods in the microbiology laboratory. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, *29*(8), 601-608. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012

Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(4), 933-951. https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001

Buermans, H. P. J., & den Dunnen, J. T. (2014). Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1842*(10), 1932-1941. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.06.015

Bush, K. (2013a). Proliferation and significance of clinically relevant β-lactamases: β-lactamase overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1277*(1), 84-90. https://doi.org/10.1111/nyas.12023

Bush, K. (2013b). The ABCD's of β-lactamase nomenclature. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *19*(4), 549-559. https://doi.org/10.1007/s10156-013-0640-7

Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(8), a025247. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247

Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of β-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(3), 969-976. https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09

Cag, Y., Caskurlu, H., Fan, Y., Cao, B., & Vahaboglu, H. (2016). Resistance mechanisms. *Annals of Translational Medicine*, *4*(17). https://doi.org/10.21037/atm.2016.09.14

Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Frontiers in Microbiology*, *3*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110

Carmo Junior, N. V. do, Filho, H. F., Gomes E Costa, D. A., Calvalcante, A. J. W., Garcia, D. de O., & Furtado, J. J. D. (2015). First report of a NDM-producing Providencia rettgeri strain in the state of São Paulo. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, *19*(6), 675-676. https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.08.008

Carvalho-Assef, A. P. D., Pereira, P. S., Albano, R. M., Berião, G. C., Chagas, T. P. G., Timm, L. N., … Asensi, M. D. (2013). Isolation of NDM-producing Providencia rettgeri in Brazil. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*(12), 2956-2957. https://doi.org/10.1093/jac/dkt298

Chihara, S., Okuzumi, K., Yamamoto, Y., Oikawa, S., & Hishinuma, A. (2011). First case of New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Escherichia coli infection in Japan. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, *52*(1), 153-154. https://doi.org/10.1093/cid/ciq054

Choi, H. K., Kim, Y. K., Kim, H. Y., Park, J. E., & Uh, Y. (2015). Clinical and microbiological features of Providencia bacteremia: Experience at a tertiary care hospital. *The Korean Journal of Internal Medicine*, *30*(2), 219-225. https://doi.org/10.3904/kjim.2015.30.2.219

Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, *3*(9), 541-548. https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24

CLSI, 2015. (s. f.). *M100-S25: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. 240.

CLSI, 2018. (s. f.). *M100-S28: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Eight Informational Supplement*.

Coculescu, B. (2009). Antimicrobial resistance induced by genetic changes. *Journal of Medicine and Life*, *2*(2), 114-123.

Collins, A. S. (2008). Preventing Health Care–Associated Infections. En R. G. Hughes (Ed.), *Patient Safety and Quality: An Evidence-Based Handbook for Nurses*. Recuperado de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2683/

Cornaglia, G., Giamarellou, H., & Rossolini, G. M. (2011). Metallo-β-lactamases: A last frontier for β-lactams? *The Lancet. Infectious Diseases*, *11*(5), 381-393. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70056-1

da Fonseca, R. R., Albrechtsen, A., Themudo, G. E., Ramos-Madrigal, J., Sibbesen, J. A., Maretty, L., … Pereira, R. J. (2016). Next-generation biology: Sequencing and data analysis approaches for non-model organisms. *Marine Genomics*, *30*, 3-13. https://doi.org/10.1016/j.margen.2016.04.012

Day, M. R., Doumith, M., Do Nascimento, V., Nair, S., Ashton, P. M., Jenkins, C., … Godbole, G. (2018). Comparison of phenotypic and WGS-derived antimicrobial resistance profiles of Salmonella enterica serovars Typhi and Paratyphi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(2), 365-372. https://doi.org/10.1093/jac/dkx379

D'Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., … Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, *477*(7365), 457-461. https://doi.org/10.1038/nature10388

De Carolis, E., Vella, A., Vaccaro, L., Torelli, R., Spanu, T., Fiori, B., … Sanguinetti, M. (2014). Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *Journal of Infection in Developing Countries*, *8*(9), 1081-1088. https://doi.org/10.3855/jidc.3623

Delcour, A. H. (2009). Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochimica et biophysica acta*, *1794*(5), 808-816. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005

Dhillon, R. H.-P., & Clark, J. (2012). ESBLs: A Clear and Present Danger? *Critical Care Research and Practice*, *2012*. https://doi.org/10.1155/2012/625170

Didelot, X., Bowden, R., Wilson, D. J., Peto, T. E. A., & Crook, D. W. (2012). Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nature Reviews. Genetics*, *13*(9), 601-612. https://doi.org/10.1038/nrg3226

Do Nascimento, V., Day, M. R., Doumith, M., Hopkins, K. L., Woodford, N., Godbole, G., & Jenkins, C. (2017). Comparison of phenotypic and WGS-derived antimicrobial resistance profiles of enteroaggregative Escherichia coli isolated from cases of diarrhoeal disease in England, 2015–16. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(12), 3288-3297. https://doi.org/10.1093/jac/dkx301

Donkor, E. S. (2013). Sequencing of Bacterial Genomes: Principles and Insights into Pathogenesis and Development of Antibiotics. *Genes*, *4*(4), 556-572. https://doi.org/10.3390/genes4040556

Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three Decades of β-Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*(1), 160-201. https://doi.org/10.1128/CMR.00037-09

Dropa, M., Ghiglione, B., Matté, M. H., Balsalobre, L. C., Lincopan, N., Matté, G. R., … Power, P. (2015). Molecular and biochemical characterization of CTX-M-131, a natural Asp240Gly variant derived from CTX-M-2, produced by a Providencia rettgeri clinical strain in São Paulo, Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(3), 1815-1817. https://doi.org/10.1128/AAC.04116-14

Du, D., Wang, Z., James, N. R., Voss, J. E., Klimont, E., Ohene-Agyei, T., … Luisi, B. F. (2014). Structure of the AcrAB–TolC multidrug efflux pump. *Nature*, *509*(7501), 512-515. https://doi.org/10.1038/nature13205

Eduard Guzmán, Antoni Romeu, & antiago Garcia-Vallve. (2008). Completely sequenced genomes of pathogenic bacteria: A review. Recuperado 18 de junio de 2019, de https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X0872665X

Ellington, M. J., Ekelund, O., Aarestrup, F. M., Canton, R., Doumith, M., Giske, C., … Woodford, N. (2017). The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: Report from the EUCAST Subcommittee. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *23*(1), 2-22. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.012

Enne, V. I., Delsol, A. A., Roe, J. M., & Bennett, P. M. (2006). Evidence of Antibiotic Resistance Gene Silencing in Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(9), 3003-3010. https://doi.org/10.1128/AAC.00137-06

Escobar Pérez, J. A., Olarte Escobar, N. M., Castro-Cardozo, B., Valderrama Márquez, I. A., Garzón Aguilar, M. I., Martinez de la Barrera, L., … Vanegas Gómez, N. (2013). Outbreak of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in a neonatal unit in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(4), 1957-1960. https://doi.org/10.1128/AAC.01447-12

Etebu, E., & Arikekpar, I. (2016). *Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives*. 12.

Falagas, M. E., Tansarli, G. S., Karageorgopoulos, D. E., & Vardakas, K. Z. (2014). Deaths Attributable to Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(7), 1170-1175. https://doi.org/10.3201/eid2007.121004

Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*(4), 661-681. https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12

Fitzpatrick, M. A., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2016). Utility of Whole-Genome Sequencing in Characterizing Acinetobacter Epidemiology and Analyzing Hospital Outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(3), 593-612. https://doi.org/10.1128/JCM.01818-15

Fournier, P.-E., Dubourg, G., & Raoult, D. (2014). Clinical detection and characterization of bacterial pathogens in the genomics era. *Genome Medicine*, *6*. https://doi.org/10.1186/s13073-014-0114-2

Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J. S., Manning, S. D., & Marrs, C. F. (2005). Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic perspectives & innovations : EP+I*, *2*, 10. https://doi.org/10.1186/1742-5573-2-10

Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O., & Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, *3*(9), 722-732. https://doi.org/10.1038/nrmicro1235

Galac, M. R., & Lazzaro, B. P. (2012). Comparative genomics of bacteria in the genus Providencia isolated from wild Drosophila melanogaster. *BMC Genomics*, *13*, 612. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-612

Gefen-Halevi, S., Hindiyeh, M. Y., Ben-David, D., Smollan, G., Gal-Mor, O., Azar, R., … Keller, N. (2013). Isolation of genetically unrelated bla(NDM-1)-positive Providencia rettgeri strains in Israel. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(5), 1642-1643. https://doi.org/10.1128/JCM.00381-13

Gibson, M. K., Forsberg, K. J., & Dantas, G. (2015). Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *The ISME Journal*, *9*(1), 207-216. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.106

Gilchrist, C. A., Turner, S. D., Riley, M. F., Petri, W. A., & Hewlett, E. L. (2015). Whole-genome sequencing in outbreak analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(3), 541-563. https://doi.org/10.1128/CMR.00075-13

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, *29*(8), 1072-1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086

Haft, D. H., Selengut, J. D., Richter, R. A., Harkins, D., Basu, M. K., & Beck, E. (2013). TIGRFAMs and Genome Properties in 2013. *Nucleic Acids Research*, *41*(Database issue), D387-D395. https://doi.org/10.1093/nar/gks1234

Hall, B. G., & Barlow, M. (2005). Revised Ambler classification of β-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *55*(6), 1050-1051. https://doi.org/10.1093/jac/dki130

Haque, M., Sartelli, M., McKimm, J., & Abu Bakar, M. (2018). Health care-associated infections – an overview. *Infection and Drug Resistance*, *11*, 2321-2333. https://doi.org/10.2147/IDR.S177247

Horiyama, T., & Nishino, K. (2014). AcrB, AcrD, and MdtABC Multidrug Efflux Systems Are Involved in Enterobactin Export in Escherichia coli. *PLOS ONE*, *9*(9), e108642. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108642

Hyatt, D., Chen, G.-L., LoCascio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W., & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, *11*, 119. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119

Jackson, R. W., Vinatzer, B., Arnold, D. L., Dorus, S., & Murillo, J. (2011). The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. *Mobile Genetic Elements*, *1*(1), 55-65. https://doi.org/10.4161/mge.1.1.16432

Jacoby, G. A. (2009). AmpC β-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, *22*(1), 161-182. https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08

Jim O'Neill. (2016, mayo). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. Recuperado 4 de octubre de 2018, de https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf

Jolley, K. A., Bliss, C. M., Bennett, J. S., Bratcher, H. B., Brehony, C., Colles, F. M., … Maiden, M. C. J. (2012). Ribosomal multilocus sequence typing: Universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology (Reading, England)*, *158*(Pt 4), 1005-1015. https://doi.org/10.1099/mic.0.055459-0

Jolley, K. A., & Maiden, M. C. J. (2010). BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*, *11*, 595. https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-595

Jolley, K. A., & Maiden, M. C. J. (2014). Using multilocus sequence typing to study bacterial variation: Prospects in the genomic era. *Future Microbiology*, *9*(5), 623-630. https://doi.org/10.2217/fmb.14.24

Jones, B. D., & Mobley, H. L. (1987). Genetic and biochemical diversity of ureases of Proteus, Providencia, and Morganella species isolated from urinary tract infection. *Infection and Immunity*, *55*(9), 2198-2203.

Joshi, N., & Fass, J. (2011). *Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files*. Recuperado de http://github.com/najoshi/sickle

Kariuki, S., Corkill, J. E., Revathi, G., Musoke, R., & Hart, C. A. (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. https://doi.org/10.1128/AAC.45.7.2141-2143.2001

Khan, A. U., Maryam, L., & Zarrilli, R. (2017). Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM): A threat to public health. *BMC Microbiology*, *17*(1), 101. https://doi.org/10.1186/s12866-017-1012-8

King, D. T., Sobhanifar, S., & Strynadka, N. C. J. (2017). The Mechanisms of Resistance to β-Lactam Antibiotics. En A. Berghuis, G. Matlashewski, M. A. Wainberg, & D. Sheppard (Eds.), *Handbook of Antimicrobial Resistance* (pp. 177-201). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0694-9_10

Kolbe, D. L., & Eddy, S. R. (2011). Fast filtering for RNA homology search. *Bioinformatics*, *27*(22), 3102-3109. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr545

Kong, K.-F., Schneper, L., & Mathee, K. (2010). Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, *118*(1), 1-36. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02563.x

Koreishi, A. F., Schechter, B. A., & Karp, C. L. (2006). Ocular infections caused by Providencia rettgeri. *Ophthalmology*, *113*(8), 1463-1466. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2006.03.047

Koser, C. U., Ellington, M. J., Cartwright, E. J. P., Gillespie, S. H., Brown, N. M., Farrington, M., … Peacock, S. J. (2012). Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. [Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't, Review]. *PLoS Pathogens*, *8*(8), e1002824. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002824

Köser, C. U., Ellington, M. J., & Peacock, S. J. (2014). Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends in Genetics: TIG*, *30*(9), 401-407. https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.003

Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., … Woodford, N. (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. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2

Kus, J. V., Tadros, M., Simor, A., Low, D. E., McGeer, A. J., Willey, B. M., … Poutanen, S. M. (2011). New Delhi metallo-β-lactamase-1: Local acquisition in Ontario, Canada, and challenges in detection. *CMAJ : Canadian Medical Association Journal*, *183*(11), 1257-1261. https://doi.org/10.1503/cmaj.110477

Lachmayr, K. L., Kerkhof, L. J., DiRienzo, A. G., Cavanaugh, C. M., & Ford, T. E. (2009). Quantifying Nonspecific TEM β-Lactamase (blaTEM) Genes in a Wastewater Stream. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(1), 203-211. https://doi.org/10.1128/AEM.01254-08

Lagesen, K., Hallin, P., Rødland, E. A., Stærfeldt, H.-H., Rognes, T., & Ussery, D. W. (2007). RNAmmer: Consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucleic Acids Research*, *35*(9), 3100-3108. https://doi.org/10.1093/nar/gkm160

Lascols, C., Hackel, M., Marshall, S. H., Hujer, A. M., Bouchillon, S., Badal, R., … Bonomo, R. A. (2011). Increasing prevalence and dissemination of NDM-1 metallo-β-lactamase in India: Data from the SMART study (2009). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(9), 1992-1997. https://doi.org/10.1093/jac/dkr240

Laslett, D., & Canback, B. (2004). ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Research*, *32*(1), 11-16. https://doi.org/10.1093/nar/gkh152

Lee, G., & Hong, J. H. (2011). Xanthogranulomatous pyelonephritis with nephrocutaneous fistula due to Providencia rettgeri infection. *Journal of Medical Microbiology*, *60*(7), 1050-1052. https://doi.org/10.1099/jmm.0.028977-0

Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2018). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*. https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275

Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., & Roy, P. H. (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(1), 185-191. https://doi.org/10.1128/aac.39.1.185

Li, J., Nation, R. L., Milne, R. W., Turnidge, J. D., & Coulthard, K. (2005). Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *25*(1), 11-25. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.10.001

Li, X.-Z., & Nikaido, H. (2009). Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: An Update. *Drugs*, *69*(12), 1555-1623. https://doi.org/10.2165/11317030-000000000-00000

Lowman, W., Sriruttan, C., Nana, T., Bosman, N., Duse, A., Venturas, J., … Coetzee, J. (2011). NDM-1 has arrived: First report of a carbapenem resistance mechanism in South Africa. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*, *101*(12), 873-875.

Löytynoja, A. (2014). Phylogeny-aware alignment with PRANK. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1079*, 155-170. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_10

Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., … Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *18*(3), 268-281. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

Magnet, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (1999). Activation of the Cryptic aac(6′)-IyAminoglycoside Resistance Gene of Salmonella by a Chromosomal Deletion Generating a Transcriptional Fusion. *Journal of Bacteriology*, *181*(21), 6650-6655.

Maiti, T. K., Pandey, P., & Singh, V. K. (2013). Providencia rettgeri: An Unusual Cause of Central Nervous System Infections. *The American Journal of the Medical Sciences*, *346*(2), 158-159. https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e318294f998

Manos, J., & Belas, R. (2006). The Genera Proteus, Providencia, and Morganella. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 245-269). https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_12

Marquez-Ortiz, R. Alejandro, Haggerty, L., Sim, E. M., Duarte, C., Castro-Cardozo, B. E., Beltran, M., … Petty, N. K. (2017). First Complete Providencia rettgeri Genome Sequence, the NDM-1-Producing Clinical Strain RB151. *Genome Announcements*, *5*(3). https://doi.org/10.1128/genomeA.01472-16

Marquez-Ortiz, Ricaurte Alejandro, Haggerty, L., Olarte, N., Duarte, C., Garza-Ramos, U., Silva-Sanchez, J., … Petty, N. K. (2017). 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. https://doi.org/10.1093/gbe/evx115

Martínez-Martínez, L., & González-López, J. J. (2014). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, *32 Suppl 4*, 4-9. https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70168-5

Marull, J. M., & De Benedetti, M. E. (2009). Automatic implantable cardioverter defibrillator pocket infection due to Providencia rettgeri: A case report. *Cases Journal*, *2*. https://doi.org/10.4076/1757-1626-2-8607

Mataseje, L. F., Boyd, D. A., Lefebvre, B., Bryce, E., Embree, J., Gravel, D., … Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. (2014). Complete sequences of a novel blaNDM-1-harbouring plasmid from Providencia rettgeri and an FII-type plasmid from Klebsiella pneumoniae identified in Canada. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *69*(3), 637-642. https://doi.org/10.1093/jac/dkt445

Maurer, F. P., Christner, M., Hentschke, M., & Rohde, H. (2017). Advances in Rapid Identification and Susceptibility Testing of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory: Implications for Patient Care and Antimicrobial Stewardship Programs. *Infectious Disease Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.4081/idr.2017.6839

McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., … Wright, G. D. (2013). The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(7), 3348-3357. https://doi.org/10.1128/AAC.00419-13

Meini, M.-R., Llarrull, L. I., & Vila, A. J. (2014). Evolution of Metallo-β-lactamases: Trends Revealed by Natural Diversity and in vitro Evolution. *Antibiotics*, *3*(3), 285-316. https://doi.org/10.3390/antibiotics3030285

Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C. A., Zentz, E. B., Leopold, S. R., Rico, A., … Karch, H. (2011). Prospective Genomic Characterization of the German Enterohemorrhagic Escherichia coli O104:H4 Outbreak by Rapid Next Generation Sequencing Technology. *PLoS ONE*, *6*(7). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022751

Michael, C. A., Dominey-Howes, D., & Labbate, M. (2014). The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management. *Frontiers in Public Health*, *2*. https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00145

Ministerio de Salud. (2014). *Detectar Prevenir y Reducir Infecciones Asociacdas con la Atención en Salud.* Recuperado de https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/CA/Detectar-Infecciones.pdf

Montealegre, M. C., Correa, A., Briceño, D. F., Rosas, N. C., De La Cadena, E., Ruiz, S. J., … Villegas, M. V. (2011). Novel VIM Metallo-β-Lactamase Variant, VIM-24, from a Klebsiella pneumoniae Isolate from Colombia▿. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *55*(5), 2428-2430. https://doi.org/10.1128/AAC.01208-10

Morgan, D. J., Lomotan, L. L., Agnes, K., McGrail, L., & Roghmann, M.-C. (2010). Characteristics of Healthcare-Associated Infections Contributing to Unexpected In-Hospital Deaths. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, *31*(8), 864-866. https://doi.org/10.1086/655018

Mukherjee, S., Stamatis, D., Bertsch, J., Ovchinnikova, G., Katta, H. Y., Mojica, A., … Reddy, T. (2018). Genomes OnLine database (GOLD) v.7: Updates and new features. *Nucleic Acids Research*. https://doi.org/10.1093/nar/gky977

Mulvey, M. R., Grant, J. M., Plewes, K., Roscoe, D., & Boyd, D. A. (2011). New Delhi metallo-β-lactamase in Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(1), 103-106. https://doi.org/10.3201/eid1701.101358

Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T., & Yamaguchi, A. (2002). The Putative Response Regulator BaeR Stimulates Multidrug Resistance of Escherichia coli via a Novel Multidrug Exporter System, MdtABC. *Journal of Bacteriology*, *184*(15), 4161-4167. https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4161-4167.2002

Neuert, S., Nair, S., Day, M. R., Doumith, M., Ashton, P. M., Mellor, K. C., … Dallman, T. J. (2018). Prediction of Phenotypic Antimicrobial Resistance Profiles From Whole Genome Sequences of Non-typhoidal Salmonella enterica. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00592

Ng, P. C., & Kirkness, E. F. (2010). Whole genome sequencing. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *628*, 215-226. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-367-1_12

Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(4), 593-656. https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003

Nikaido, H., & Pagès, J.-M. (2012). Broad Specificity Efflux pumps and Their Role in Multidrug Resistance of Gram Negative Bacteria. *FEMS microbiology reviews*, *36*(2), 340-363. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00290.x

Nishino, K., Nikaido, E., & Yamaguchi, A. (2007). Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, *189*(24), 9066-9075. https://doi.org/10.1128/JB.01045-07

Nordmann, P. (2010). [Gram-negative bacteriae with resistance to carbapenems]. *Medecine Sciences: M/S*, *26*(11), 950-959. https://doi.org/10.1051/medsci/20102611950

Nordmann P, Dortet L, & Poirel L. (2012). *Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: Here is the storm! 18(5), 263–272*. Recuperado de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22480775

Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(10), 1791-1798. https://doi.org/10.3201/eid1710.110655

Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T. R., & Livermore, D. M. (2011). The emerging NDM carbapenemases. *Trends in Microbiology*, *19*(12), 588-595. https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.09.005

O'Hara, C. M., Brenner, F. W., & 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., & 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. https://doi.org/10.1093/gbe/evv195

OMS. (2014). ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance. *World Health Organization*. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf;jsessionid=BA7418BDEB041AB010ACB52E19453386?sequence=1

OMS. (2015). Resistencia a los antimicrobianos. Proyecto de plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. 68.ª ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD. *Organización Mundial e la Salud*.

Oniciuc, E. A., Likotrafiti, E., Alvarez-Molina, A., Prieto, M., Santos, J. A., & Alvarez-Ordóñez, A. (2018). The Present and Future of Whole Genome Sequencing (WGS) and Whole Metagenome Sequencing (WMS) for Surveillance of Antimicrobial Resistant Microorganisms and Antimicrobial Resistance Genes across the Food Chain. *Genes*, *9*(5). https://doi.org/10.3390/genes9050268

OPS. (2011). *Alerta epidemiológica: Primer hallazgo de carbapenemasas de tipo New Delhi metalobetalactamasas (NDM) en Latinoamérica*. Recuperado de https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2012/22-noviembre-2011-carbapenemasas-americas1.pdf

OPS, & OMS. (2014). *Actualización Epidemiológica Carbapenemasas tipo New Delhi metalobetalactamasas (NDM)*. Recuperado de https://www.cocemi.com.uy/docs/carbapenemasas-actualizacion_Mar2014.pdf

Oteo, J., Miró, E., Pérez-Vázquez, M., & Navarro, F. (2014). Evolution of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the global and national level: What should be expected in the future? *Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, *32 Suppl 4*, 17-23. https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70170-3

Otlu, B., Yakupoğulları, Y., Gürsoy, N. C., Duman, Y., Bayındır, Y., Tekerekoğlu, M. S., & Ersoy, Y. (2018). Co-production of OXA-48 and NDM-1 Carbapenemases in Providencia rettgeri: The first report. *Mikrobiyoloji Bulteni*, *52*(3), 300-307. https://doi.org/10.5578/mb.67153

Ovalle, M. V., Rojas, S. Y. S., Valderrama, C. D., & Durán, M. A. (2016). *Resultados del Programa de Vigilancia por Laboratorio de Resistencia antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) 2016*. 43.

Padungtod, P., Tribuddharat, C., & Chuanchuen, R. (2011). Widespread presence of dfrA12 and its association with dfrA12-aadA2 cassette in Salmonella enterica isolates from swine. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, *42*(6), 1471-1476.

Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., … Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *31*(22), 3691-3693. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421

Pagès, J.-M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(12), 893-903. https://doi.org/10.1038/nrmicro1994

Pagès, J.-M., Peslier, S., Keating, T. A., Lavigne, J.-P., & Nichols, W. W. (2016). Role of the Outer Membrane and Porins in Susceptibility of β-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae to Ceftazidime-Avibactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(3), 1349-1359. https://doi.org/10.1128/AAC.01585-15

Pagès, J.-M., Sandrine, A.-F., Mahamoud, A., Bolla, J.-M., Davin-Regli, A., Chevalier, J., & Garnotel, E. (2010). Efflux pumps of gram-negative bacteria, a new target for new molecules. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *10*(18), 1848-1857.

Palzkill, T. (2013). Metallo-β-lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1277*, 91-104. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x

Parizad, E. G., Parizad, E. G., & Valizadeh, A. (2016). The Application of Pulsed Field Gel Electrophoresis in Clinical Studies. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, *10*(1), DE01-DE04. https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15718.7043

Park, S. T., & Kim, J. (2016). Trends in Next-Generation Sequencing and a New Era for Whole Genome Sequencing. *International Neurourology Journal*, *20*(Suppl 2), S76-83. https://doi.org/10.5213/inj.1632742.371

Pasteran, F., Albornoz, E., Faccone, D., Gomez, S., Valenzuela, C., Morales, M., … Corso, A. (2012). Emergence of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in Guatemala. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(7), 1795-1797. https://doi.org/10.1093/jac/dks101

Pasteran, F., Meo, A., Gomez, S., Derdoy, L., Albronoz, E., Faccone, D., … Corso, A. (2014). Emergence of genetically related NDM-1-producing Providencia rettgeri strains in Argentina. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *2*(4), 344-345. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.07.003

Pereira, P. S., Albano, R. M., Asensi, M. D., & Carvalho-Assef, A. P. D. (2015). Draft genome sequences of three NDM-1-producing Enterobacteriaceae species isolated from Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *110*(4), 580-582. https://doi.org/10.1590/0074-02760150081

Pérez, A., Poza, M., Fernández, A., Fernández, M. del C., Mallo, S., Merino, M., … Bou, G. (2012). Involvement of the AcrAB-TolC Efflux Pump in the Resistance, Fitness, and Virulence of Enterobacter cloacae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(4), 2084-2090. https://doi.org/10.1128/AAC.05509-11

PEREZ, F., & VAN DUIN, D. (2013). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A menace to our most vulnerable patients. *Cleveland Clinic journal of medicine*, *80*(4), 225-233. https://doi.org/10.3949/ccjm.80a.12182

Perry, J. D., Naqvi, S. H., Mirza, I. A., Alizai, S. A., Hussain, A., Ghirardi, S., … Raza, M. W. (2011). Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *66*(10), 2288-2294. https://doi.org/10.1093/jac/dkr299

Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, *8*(10), 785-786. https://doi.org/10.1038/nmeth.1701

Philippon, A., Arlet, G., & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(1), 1-11.

Piddock, L. J. V. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(2), 382-402. https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006

Poirel, L., Gniadkowski, M., & Nordmann, P. (2002). Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *50*(6), 1031-1034.

Poirel, L., Lagrutta, E., Taylor, P., Pham, J., & Nordmann, P. (2010). Emergence of Metallo-β-Lactamase NDM-1-Producing Multidrug-Resistant Escherichia coli in Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(11), 4914-4916. https://doi.org/10.1128/AAC.00878-10

Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2010). Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(1), 24-38. https://doi.org/10.1128/AAC.01512-08

Poirel, L., Pitout, J. D., & Nordmann, P. (2007). Carbapenemases: Molecular diversity and clinical consequences. [Journal Article, Review]. *Future Microbiology*, *2*(5), 501-512. https://doi.org/10.2217/17460913.2.5.501

Pollett, S., Miller, S., Hindler, J., Uslan, D., Carvalho, M., & Humphries, R. M. (2014). Phenotypic and Molecular Characteristics of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in a Health Care System in Los Angeles, California, from 2011 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(11), 4003-4009. https://doi.org/10.1128/JCM.01397-14

Poole, K. (2004). Resistance to β-lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *61*(17), 2200-2223. https://doi.org/10.1007/s00018-004-4060-9

Poole, Keith. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *56*(1), 20-51. https://doi.org/10.1093/jac/dki171

Potter, R. F., Wallace, M. A., McMullen, A. R., Prusa, J., Stallings, C. L., Burnham, C. a. D., & Dantas, G. (2018). BlaIMP-27 on transferable plasmids in Proteus mirabilis and Providencia rettgeri. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *24*(9), 1019.e5-1019.e8. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.018

Potter, Robert F., D'Souza, A. W., & Dantas, G. (2016). The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, *29*, 30-46. https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.09.002

Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2009). FastTree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular Biology and Evolution*, *26*(7), 1641-1650. https://doi.org/10.1093/molbev/msp077

Punta, M., Coggill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., … Finn, R. D. (2012). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, *40*(Database issue), D290-D301. https://doi.org/10.1093/nar/gkr1065

Quainoo, S., Coolen, J. P. M., van Hijum, S. A. F. T., Huynen, M. A., Melchers, W. J. G., van Schaik, W., & Wertheim, H. F. L. (2017). Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: The Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, *30*(4), 1015-1063. https://doi.org/10.1128/CMR.00016-17

Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: The Versatile β-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, *20*(3), 440-458. https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07

Rankin, D. J., Rocha, E. P. C., & Brown, S. P. (2011). What traits are carried on mobile genetic elements, and why? *Heredity*, *106*(1), 1-10. https://doi.org/10.1038/hdy.2010.24

Rasheed, J. K., Kitchel, B., Zhu, W., Anderson, K. F., Clark, N. C., Ferraro, M. J., … Limbago, B. M. (2013). New Delhi Metallo-β-Lactamase–producing Enterobacteriaceae, United States. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(6), 870-878. https://doi.org/10.3201/eid1906.121515

Reuter, S., Ellington, M. J., Cartwright, E. J. P., Koser, C. U., Torok, M. E., Gouliouris, T., … Peacock, S. J. (2013). Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology. [Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't]. *JAMA Internal Medicine*, *173*(15), 1397-1404. https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2013.7734

Rose, W. E., & Rybak, M. J. (2006). Tigecycline: First of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy*, *26*(8), 1099-1110. https://doi.org/10.1592/phco.26.8.1099

Rossen, J. W. A., Friedrich, A. W., & Moran-Gilad, J. (2018). Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clinical Microbiology and Infection*, *24*(4), 355-360. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.001

Ruiz, J., Castro, D., Goñi, P., Santamaria, J. A., Borrego, J. J., & Vila, J. (1997). Analysis of the mechanism of quinolone resistance in nalidixic acid-resistant clinical isolates of Salmonella serotype Typhimurium. *Journal of Medical Microbiology*, *46*(7), 623-628. https://doi.org/10.1099/00222615-46-7-623

Rumbo, C., Gato, E., López, M., Ruiz de Alegría, C., Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., … Tomás, M. (2013). Contribution of Efflux Pumps, Porins, and β-Lactamases to Multidrug Resistance in Clinical Isolates of Acinetobacter baumannii. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(11), 5247-5257. https://doi.org/10.1128/AAC.00730-13

Rupp, M. E., & Fey, P. D. (2003). Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*, *63*(4), 353-365. https://doi.org/10.2165/00003495-200363040-00002

Saavedra-Rojas, S.-Y., Duarte-Valderrama, C., González-de-Arias, M.-N., & Ovalle-Guerro, M. V. (2017). Emergencia de Providencia rettgeri NDM-1 en dos departamentos de Colombia, 2012-2013. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *35*(6), 354-358. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.05.011

Sader, H. S., Mendes, R. E., Pfaller, M. A., Shortridge, D., Flamm, R. K., & Castanheira, M. (2018). Antimicrobial Activities of Aztreonam-Avibactam and Comparator Agents against Contemporary (2016) Clinical Enterobacteriaceae Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(1), e01856-17. https://doi.org/10.1128/AAC.01856-17

Sadouki, Z., Day, M. R., Doumith, M., Chattaway, M. A., Dallman, T. J., Hopkins, K. L., … Jenkins, C. (2017). Comparison of phenotypic and WGS-derived antimicrobial resistance profiles of Shigella sonnei isolated from cases of diarrhoeal disease in England and Wales, 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(9), 2496-2502. https://doi.org/10.1093/jac/dkx170

Safdar, N., Anderson, D. J., Braun, B. I., Carling, P., Cohen, S., Donskey, C., … Zerr, D. M. (2014). The Evolving Landscape of Healthcare-Associated Infections: Recent Advances in Prevention and a Road Map for Research. *Infection control and hospital epidemiology*, *35*(5), 480-493. https://doi.org/10.1086/675821 Sagar, S. (2017). Providencia Rettgeri: An Emerging Nosocomial Uropathogen in an Indwelling Urinary Catheterised Patient. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/25740.10026

Salipante, S. J., SenGupta, D. J., Cummings, L. A., Land, T. A., Hoogestraat, D. R., & Cookson, B. T. (2015). Application of Whole-Genome Sequencing for Bacterial Strain Typing in Molecular Epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology*, *53*(4), 1072-1079. https://doi.org/10.1128/JCM.03385-14

Sato, T., Hara, T., Horiyama, T., Kanazawa, S., Yamaguchi, T., & Maki, H. (2015). Mechanism of resistance and antibacterial susceptibility in extended-spectrum β-lactamase phenotype Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca isolated between 2000 and 2010 in Japan. *Journal of Medical Microbiology*, *64*(Pt 5), 538-543. https://doi.org/10.1099/jmm.0.000057

Scarafile, G. (2016). Antibiotic resistance: Current issues and future strategies. *Reviews in Health Care*, *7*(1), 3-16. https://doi.org/10.7175/rhc.v7i1.1226

Schechter, L. M., Creely, D. P., Garner, C. D., Shortridge, D., Nguyen, H., Chen, L., … Leopold, S. R. (2018). Extensive Gene Amplification as a Mechanism for Piperacillin-Tazobactam Resistance in Escherichia coli. *MBio*, *9*(2). https://doi.org/10.1128/mBio.00583-18

Schürch, A. C., Arredondo-Alonso, S., Willems, R. J. L., & Goering, R. V. (2018). Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *24*(4), 350-354. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.016

Secretaría Distrital de Salud, & Sub-dirección Vigilancia en Salud Pública. (2015). *Lineamientos 2015, Infecciones Asociadas a la Atención en Salud*.

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

SenGupta, D. J., Cummings, L. A., Hoogestraat, D. R., Butler-Wu, S. M., Shendure, J., Cookson, B. T., & Salipante, S. J. (2014). Whole-Genome Sequencing for High-Resolution Investigation of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Epidemiology and Genome Plasticity. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(8), 2787-2796. https://doi.org/10.1128/JCM.00759-14

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. Mohd. D., & Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *22*(1), 90-101. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002

Shaista Nazir, Angmo Dekyong, Bashir A Fomda, Shazia Benazir, Asifa Bhat, & Lenah Bashir. (2017). PROVIDENCIA RETTGERI: AN UNEXPECTED CAUSE OF SEPSIS. Recuperado 4 de mayo de 2019, de ResearchGate website: https://www.researchgate.net/publication/322503225_PROVIDENCIA_RETTGERI_AN_UNEXPECTED_CAUSE_OF_SEPSIS

Sharma, D., Sharma, P., & Soni, P. (2017). First case report of Providencia Rettgeri neonatal sepsis. *BMC Research Notes*, *10*. https://doi.org/10.1186/s13104-017-2866-4

Sherry, N. L., Porter, J. L., Seemann, T., Watkins, A., Stinear, T. P., & Howden, B. P. (2013). Outbreak Investigation Using High-Throughput Genome Sequencing within a Diagnostic Microbiology Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(5), 1396-1401. https://doi.org/10.1128/JCM.03332-12 Shin, S., Jeong, S. H., Lee, H., Hong, J. S., Park, M.-J., & 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. https://doi.org/10.1186/s12941-018-0272-y

Shiroto, K., Ishii, Y., Kimura, S., Alba, J., Watanabe, K., Matsushima, Y., & Yamaguchi, K. (2005). Metallo-beta-lactamase IMP-1 in Providencia rettgeri from two different hospitals in Japan. [Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of Medical Microbiology*, *54*(Pt 11), 1065-1070. https://doi.org/10.1099/jmm.0.46194-0

Stock, I. (2014). Infectious diseases caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae—A particular challenge for antibacterial therapy. *Medizinische Monatsschrift Fur Pharmazeuten*, *37*(5), 162-172; quiz 173-174.

Stoesser, N., Batty, E. M., Eyre, D. W., Morgan, M., Wyllie, D. H., Del Ojo Elias, C., … Crook, D. W. (2013). Predicting antimicrobial susceptibilities for Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates using whole genomic sequence data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*(10), 2234-2244. https://doi.org/10.1093/jac/dkt180

Struelens, M. J., Monnet, D. L., Magiorakos, A. P., Santos O'Connor, F., Giesecke, J., & European NDM-1 Survey Participants. (2010). New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing Enterobacteriaceae: Emergence and response in Europe. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, *15*(46).

Sugawara, E., Kojima, S., & Nikaido, H. (2016). Klebsiella pneumoniae Major Porins OmpK35 and OmpK36 Allow More Efficient Diffusion of β-Lactams than Their Escherichia coli Homologs OmpF and OmpC. *Journal of Bacteriology*, *198*(23), 3200-3208. https://doi.org/10.1128/JB.00590-16

Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, Resistome and Resistance Mechanisms: A Bacterial Perspective. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066

Sundsfjord, A., Simonsen, G. S., Haldorsen, B. C., Haaheim, H., Hjelmevoll, S.-O., Littauer, P., & Dahl, K. H. (2004). Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, *112*(11-12), 815-837. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2004.apm11211-1208.x

Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Dahal, R. K., Sah, M. K., Ohara, H., Shimada, K., … 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*, 56. https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-56

Tagini, F., & Greub, G. (2017). Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: A pathogen-oriented review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *36*(11), 2007-2020. https://doi.org/10.1007/s10096-017-3024-6

Thiolas, A., Bornet, C., Davin-Régli, A., Pagès, J.-M., & Bollet, C. (2004). Resistance to imipenem, cefepime, and cefpirome associated with mutation in Omp36 osmoporin of Enterobacter aerogenes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *317*(3), 851-856. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.130

Trivedi MK, Shettigar H, Bairwa K, & Jana S. (2015). Effect of Biofield Treatment on Phenotypic and Genotypic Characteristic of Provindencia rettgeri. Recuperado 29 de diciembre de 2018, de Trivedi Science website: https://www.trivedieffect.com/the-science/publications/biotechnology-publication/effect-of-biofield-treatment-on-phenotypic-and-genotypic-characteristic-of-provindencia-rettgeri/

Tshisevhe, V. S., Lekalakala, M. R., Tshuma, N., Janse van Rensburg, S., & Mbelle, N. (2016). Outbreak of carbapenem-resistant Providencia rettgeri in a tertiary hospital. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*, *107*(1), 31-33. https://doi.org/10.7196/SAMJ.2016.v107.i1.12002

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project: Exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*, *449*(7164), 804-810. https://doi.org/10.1038/nature06244

Tyson, G. H., McDermott, P. F., Li, C., Chen, Y., Tadesse, D. A., Mukherjee, S., … Zhao, S. (2015). WGS accurately predicts antimicrobial resistance in Escherichia coli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(10), 2763-2769. https://doi.org/10.1093/jac/dkv186

Urwin, R., & Maiden, M. C. J. (2003). Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology*, *11*(10), 479-487.

Vedant Vikrom Borah, Arabinda Ghosh, Mohd Shahbaaz, Imtaiyaz Hassan, & Kandarpa K Saikia. (2018, marzo). Omp 36 mediated meropenem resistance in clinical isolates of klebsiella pneumonia. Recuperado 11 de junio de 2019, de ResearchGate website: https://www.researchgate.net/publication/323607329_Omp_36_mediated_meropenem_resistance_in_clinical_isolates_of_klebsiella_pneumonia

Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. *Pharmacy and Therapeutics*, *40*(4), 277-283.

Walsh, T. R. (2010). Emerging carbapenemases: A global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *36 Suppl 3*, S8-14. https://doi.org/10.1016/S0924-8579(10)70004-2

Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2005). Metallo-β-Lactamases: The Quiet before the Storm? *Clinical Microbiology Reviews*, *18*(2), 306-325. https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005

Walsh, T. R., Weeks, J., Livermore, D. M., & 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. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70059-7

Walther-Rasmussen, J., & Høiby, N. (2006). OXA-type carbapenemases. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *57*(3), 373-383. https://doi.org/10.1093/jac/dki482

Wang, G.-H., & Brucker, R. M. (2019). Genome Sequence of Providencia rettgeri NVIT03, Isolated from Nasonia vitripennis. *Microbiology Resource Announcements*, *8*(3). https://doi.org/10.1128/MRA.01157-18

Washington, M. A., Barnhill, J., & Griffin, J. M. (2015). A Case of Wound Infection with Providencia rettgeri and Coincident Gout in a Patient from Guam. *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health*, *74*(11), 375-377.

Wei, W.-J., Yang, H.-F., Ye, Y., & Li, J.-B. (2015). New Delhi Metallo-β-Lactamase-Mediated Carbapenem Resistance: Origin, Diagnosis, Treatment and Public Health Concern. *Chinese Medical Journal*, *128*(14), 1969-1976. https://doi.org/10.4103/0366-6999.160566

WHO. (2017). *GLOBAL PRIORITY LIST OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA TO GUIDE RESEARCH, DISCOVERY, AND DEVELOPMENT OF NEW ANTIBIOTICS*. Recuperado de http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf

Wie, S.-H. (2015). Clinical significance of Providencia bacteremia or bacteriuria. *The Korean Journal of Internal Medicine*, *30*(2), 167-169. https://doi.org/10.3904/kjim.2015.30.2.167

Williamson, R., Collatz, E., & Gutmann, L. (1986). [Mechanisms of action of beta-lactam antibiotics and mechanisms of non-enzymatic resistance]. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)*, *15*(46), 2282-2289.

Wu, P. J., Shannon, K., & Phillips, I. (1995). Mechanisms of hyperproduction of TEM-1 beta-lactamase by clinical isolates of Escherichia coli. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *36*(6), 927-939. https://doi.org/10.1093/jac/36.6.927

Wu, W., Feng, Y., Tang, G., Qiao, F., McNally, A., & Zong, Z. (2019). NDM Metallo-β-Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(2), e00115-18. https://doi.org/10.1128/CMR.00115-18

Yoh, M., Matsuyama, J., Ohnishi, M., Takagi, K., Miyagi, H., Mori, K., … Honda, T. (2005). Importance of Providencia species as a major cause of travellers' diarrhoea. *Journal of Medical Microbiology*, *54*(11), 1077-1082. https://doi.org/10.1099/jmm.0.45846-0

Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a New Metallo-β-Lactamase Gene, blaNDM-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. https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09

Zankari, E., Hasman, H., Kaas, R. S., Seyfarth, A. M., Agersø, Y., Lund, O., … Aarestrup, F. M. (2013). Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*(4), 771-777. https://doi.org/10.1093/jac/dks496

Zhao, W.-H., & 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. https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460

Zhou, G., Guo, S., Luo, Y., Ye, L., Song, Y., Sun, G., … Yang, J. (2014). NDM-1–producing Strains, Family Enterobacteriaceae, in Hospital, Beijing, China. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(2), 340-342. https://doi.org/10.3201/eid2002.121263

Zhou, K., Tao, Y., Han, L., Ni, Y., & Sun, J. (2019). Piperacillin-Tazobactam (TZP) Resistance in Escherichia coli Due to Hyperproduction of TEM-1 β-Lactamase Mediated by the Promoter Pa/Pb. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 833. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00833

Zmarlicka, M. T., Nailor, M. D., & Nicolau, D. P. (2015). Impact of the New Delhi metallo-beta-lactamase on beta-lactam antibiotics. *Infection and Drug Resistance*, *8*, 297-309. https://doi.org/10.2147/IDR.S39186

Zurita, J., Parra, H., Gestal, M. C., McDermott, J., & Barba, P. (2015). First case of NDM-1-producing Providencia rettgeri in Ecuador. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *3*(4), 302-303. https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.07.003