

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BACILOS GRAM NEGATIVOS
PRODUCTORES DE BETALACTAMASAS TIPO CARBAPENEMASAS
PROVENIENTES DE CENTROS HOSPITALARIOS DE TRES MUNICIPIOS DE
ANTIOQUIA ENTRE LOS AÑOS 2013 – 2015**

ANA MERCEDES RADA BRAVO

CORPORACIÓN ACADÉMICA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLÍN

2020

Caracterización molecular de bacilos Gram negativos productores de betalactamasas tipo carbapenemasas provenientes de centros hospitalarios de tres municipios de Antioquia entre los años 2013 – 2015

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Básicas Biomédicas

Énfasis en Biología Molecular

Universidad de Antioquia

Presenta

Ana Mercedes Rada Bravo

Director

Eliana Restrepo pineda, PhD

Comité tutorial

Adriana Correa Bermúdez, PhD

Cesar Antonio Capataz Tafur, MD

CORPORACIÓN ACADÉMICA CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLÍN

2020

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido un trabajo de gran importancia en mi vida profesional, el cual me permitió conocer y compartir con personas maravillosas que me ayudaron a crecer académicamente. Quiero expresar mi agradecimiento a mi tutora la doctora Eliana Restrepo y al comité tutorial, la doctora Adriana Correa y el doctor Cesar Capataz por su tiempo y contribuciones académicas que me permitieron andar por el camino correcto.

Igualmente, por el increíble trabajo interdisciplinario con los Microbiólogos e Infectólogos de los Comités de infecciones de los hospitales de estudio, especialmente al doctor Cesar Capataz y al doctor Carlos Agudelo, por contribuir en mi formación, enseñarme a través de sus experiencias y sus importantes aportes durante el proyecto. Gracias por que me abrieron las puertas a un trabajo en conjunto que generó la toma de decisiones para contribuir positivamente en sus instituciones.

Quiero expresar mi sincero reconocimiento al doctor Cesar Arias y a la doctora María Virginia Villegas, así como a los integrantes de sus grupos de investigación en Houston y Colombia, que me ayudaron y aportaron en la fase experimental durante mis pasantías. Agradezco a estos dos grandes líderes en la línea de resistencia bacteriana, por sembrar en mi una mayor pasión en la línea, enseñarme a investigar, a realizar siempre una evaluación crítica del conocimiento y comprender que con esfuerzo, disciplina, dedicación y perseverancia se logra lo que pensamos imposible.

También agradezco a Colciencias, por la financiación en mis estudios. Igualmente, al grupo Bacteria & Cáncer de la Universidad de Antioquia y al grupo Biociencias de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, por sus contribuciones en el laboratorio y desarrollo del proyecto. Un reconocimiento a Ángela Gaviria, Decana de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, por su apoyo incondicional.

No hay palabras para expresar el amor y agradecimiento durante el tiempo de la realización de mi Doctorado, a Dios, mi familia y amigos, han sido ustedes el apoyo fundamental para mi crecimiento personal, lo que ha permitido el desarrollo de los valores humanos esenciales para el desarrollo de mi vida académica.

Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras	ix
Abreviaturas	xii
Resumen	xv
Abstract	xiii
1 Introducción general	1
1.1 Antecedentes	2
1.2 Esquema de la tesis	6
2 Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016	9
2.1 Introducción	11
2.2 Clasificación de betalactamasas	14
2.3 Betalactamasas de espectro extendido en Colombia	15
2.3.1 Enzimas TEM y SHV	16
2.3.2 Enzimas CTX-M	17
2.4 Betalactamasas de tipo AmpC en Colombia	22
2.5 Betalactamasas de tipo carbapenemasas en Colombia	24
2.5.1 Carbapenemasas de clase A	25
2.5.1.1 Enzimas NMC-A	25
2.5.1.2 Enzimas KPC	25
2.5.1.3 Enzimas GES	28
2.5.2 Carbapenemasas de clase B	29
2.5.2.1 Enzimas IMP	29
2.5.2.2 Enzimas VIM	30
2.5.2.3 Enzimas NDM	32
2.5.3 Carbapenemasas de clase D	33
2.5.3.1 Enzimas OXA	33
2.6 Conclusión	36

Índice general

2.7 Referencias	37
3 Planteamiento del problema de investigación	60
3.1 Planteamiento del problema	61
3.2 Justificación	63
3.3 Objetivos	64
3.3.1 Objetivo general	64
3.3.2 Objetivos específicos	64
4 Dynamics of <i>bla</i> _{KPC-2} dissemination from non-CG258 <i>Klebsiella pneumoniae</i> to other <i>Enterobacteriales</i> via IncN plasmids in an area of high endemicity	65
4.1 Introduction	67
4.2 Materials and methods	69
4.2.1 Strain selection and clinical and epidemiological characterization	69
4.2.2 Bacterial identification, antibiotic susceptibility testing, and detection of the <i>bla</i> _{KPC} gene	70
4.2.3 Whole-genome sequencing	71
4.2.3.1 In silico MLST, genome annotation, virulence factors and capsular typing	72
4.2.3.2 Phylogenetic analysis	72
4.2.4 Transferability of the <i>bla</i> _{KPC} gene and plasmid analysis	73
4.3 Results	75
4.3.1 Infection/colonization by KPC-producing <i>Enterobacteriales</i> in neonates and adults	75
4.3.2 Non-CG258 <i>K. pneumoniae</i> in the outbreak setting shared an IncN plasmid	76
4.3.3 Simultaneous circulation of <i>K. pneumoniae</i> CG258 harboring <i>bla</i> _{KPC-3} favors dissemination of carbapenem resistance	78
4.3.4 Interspecies transmission of IncN plasmids carrying <i>bla</i> _{KPC-2} carbapenemase	79
4.3.5 Characterization of IncN plasmids involved in dissemination of <i>bla</i> _{KPC-2}	83
4.4 Discussion	86
4.5 Conclusions	90
4.6 References	91

Índice general

5	<i>Escherichia coli</i> ST471 producing VIM-4 metallo- β -lactamase in Colombia: a brief report	102
5.1	Brief report	104
5.2	References	111
6	Genetic diversity of multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates carrying <i>bla</i> _{VIM-2} and <i>bla</i> _{KPC-2} genes that spread on different genetic environment in Colombia	118
6.1	Introduction	120
6.2	Materials and methods	121
6.2.1	Bacterial isolates and clinical data	121
6.2.2	Identification, antimicrobial susceptibility testing and carbapenemases detection	122
6.2.3	Molecular typing and Whole-genome sequencing	123
6.2.3.1	Genome annotation	124
6.2.3.2	Phylogenetic analyses	124
6.2.4	Statistical analysis	125
6.3	Results	125
6.3.1	Infection and colonization by carbapenem-resistant <i>P. aeruginosa</i>	125
6.3.2	Diverse genetic background of multidrug-resistant <i>P. aeruginosa</i> isolates carrying <i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{VIM}	127
6.3.3	Diversity of structures surrounding <i>bla</i> _{VIM-2} in <i>P. aeruginosa</i> isolates	129
6.3.4	Transferring a plasmid carrying <i>bla</i> _{KPC-2} in a case of infection by <i>P. aeruginosa</i>	131
6.4	Discussion	134
6.5	Conclusions	138
6.6	References	139
7	Discusión general	150
7.1	Discusión	151
8	Conclusiones	158
8.1	Conclusiones	159
9	Aportes científicos y perspectivas	160
9.1	Aportes científicos	161

Índice general

9.2 Perspectivas	161
Anexos	163
Anexo A	164
Anexo B	173
Referencias	177
Introducción general	178
Planteamiento del problema	182
Discusión general	183
Proceso formativo del autor	188

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2

Tabla 1 Betalactamasas reportadas en Colombia, 2001-2016	18
--	----

Capítulo 4

Table 1 Molecular characteristics of 72 KPC-producing Enterobacterales isolates sequenced by illumina platform	82
--	----

Anexo A

Supplemental material-chapter 4

Table S1 Demographic and clinical characteristics of adults infected or colonized by KPC-producing <i>Enterobacterales</i>	170
--	-----

Table S2 Demographic and clinical characteristics of neonates colonized by KPC-producing <i>Enterobacterales</i>	171
--	-----

Anexo B

Supplemental material-chapter 6

Table S1 Demographic and clinical characteristics of patients infected or colonized by Carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	175
---	-----

Table S2 Percentages of isolates resistance to antibiotics among carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates	176
---	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1 Distribución de BLEE y AmpC en enterobacterias en Colombia	20
Figura 2 Distribución de carbapenemasas de clase A, B y D en Colombia	29
Figura 3 Variantes de BLEE, AmpC y carbapenemasas detectadas en Colombia, 2001-2016	35

Capítulo 4

Figure 1 Phylogenetic tree showing the genetic relationships among isolates of <i>Klebsiella</i> spp. (n=29), <i>E. coli</i> (n=12), and <i>Enterobacter cloacae</i> complex (n=20) harborin bla _{KPC}	81
Figure 2 (a) Blast Ring Image Generator (BRIG 0.95 and BLASTN v2.2.29) alignment of 24 sequenced bla _{KPC-2} -carrying <i>Enterobacterales</i> and the Tc_C1-205 transconjugant harboring the annotated pIncN_C1-94_KPC	85
Figure 2 (b) Blast Ring Image Generator (BRIG 0.95 and BLASTN v2.2.29) of six sequenced of bla _{KPC-2} -carrying <i>Enterobacterales</i> isolates using plasmid pEC881 as reference from an <i>E. coli</i> recovered in Cali, Colombia, 2013	85
Figure 3 Timeline of the outbreak and dissemination of bla _{KPC-2} among different <i>Enterobacterales</i> in hospitals located in Medellín and surrounding areas (2013 to 2015)	89

Capítulo 5

Figure 1 Alignment of the contigs of C2-70 isolate with the bla _{VIM-4} region of KP3686 and plasmid pKKp4-VIM using Easyfigure	108
--	-----

Índice de figuras

Figure 2 Plasmid location of <i>bla</i> _{VIM-4} on insolate C2-70 confirmed by S1-Pulsed-Field Gel Electrophoresis (S1-PFGE) and southern hybridization with a <i>bla</i> _{VIM} probe	109
---	-----

Capítulo 6

Figure 1 Phylogenetic tree showing the genetic relationships among isolates of <i>P. aeruginosa</i>	128
Figure 2 Genetic comparison of the <i>bla</i> _{VIM-2} -containing class 1 integrons detected in this study and genetic cassette arrays	130
Figure 3 Timeline of antimicrobial treatment and bacterial identification	131
Figure 4 (a) Comparison of Tn440Ib containing <i>bla</i> _{KPC-2} gene identified in two isolates of <i>P. aeruginosa</i> from a same patient (C2-102-3 and C2-102-4) with isoform Tn440Ib from <i>P. aeruginosa</i> COL-1 from Colombia	133
Figure 4 (b) BLAST Ring Image Generator (BRIG 0.95 and BLASTN v2.2.29) of comparison of the annotated plasmid from <i>P. aeruginosa</i> PABCH05 strain, Boston, US, with C2-102-3 and C2-102-4 isolates sequenced in this study	133

Anexo A

Supplemental material-chapter 4

Figure S1 Schematic representation of the novel Tn440Ib (13.685 bp) containing <i>bla</i> _{KPC-2} , showing common structures with isoform Tn440Ib (10.016 bp)	165
Figure S2 Comparison of the annotated plasmid of reference pBK15692 harboring <i>bla</i> _{KPC-3} (New York/ New Jersey, 2005) with C1-78 isolate sequenced in this study and COL-Kpn48 isolate from Colombia, 2007	166

Índice de figuras

Figure S3 Phylogenetic tree showing the genetic relationships among 5 isolates of genus <i>Citrobacter</i> and 6 isolates of <i>S. marcescens</i> harboring <i>bla</i> _{KPC} , generated by RAxML and visualized by iTOL program	167
Figure S4 Schematic representation of the genetic environment of <i>mcr-9</i> gene identified in <i>E. kobei</i> (C1-19) and <i>E. hormaechei</i> (C2-37) isolates carrying <i>bla</i> _{KPC-2}	168
Figure S5 Plasmid location of <i>bla</i> _{KPC-2} on <i>Enterobacterales</i> recovered from neonates involved in an outbreak, adults from hospital 1 and 2 and Tc_C1-205 transconjugant confirmed by S1 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (S1-PFGE) and Southern hybridization with a <i>bla</i> _{KPC-2} probe ...	169

Anexo B

Supplemental material-chapter 6

Figure S1 Dendrogram depicting genetic relatedness of carbapenemases-producing <i>P. aeruginosa</i> isolates by repetitive sequence-based PCR (rep-PCR)	174
---	-----

Español

BLEE	Betalactamasas de Espectro Extendido
CTX-M	Cefotaximasas
EGMs	Elementos Genéticos Móviles
EPC	<i>Enterobacteriales</i> Productores de Carbapenemasas
GC	Grupo Clonal
GES	Betalactamasas de Espectro Extendido de Guyana
IIA	Infecciones Intraabdominales
IMP	Betalactamasa de Clase B que Hidroliza Imipenem
ISQ	Infecciones del Sitio Quirúrgico
ITU	Infecciones de Tracto Urinario
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Productora de Carbapenemasas
MBLs	Metalo-betalactamasas
NAVM	Neumonía Asociada a Ventilación Mecánica
NDM	Metalo-betalactamasas de tipo Nueva Delhi
NMC-A	No Metalo-carbapenemasas de Clase A
OXA	Oxacilinasas
SHV	Betalactamasa de Espectro Extendido Variable de Sulfhidrilo
TEM	Betalactamasa de Espectro Extendido de Tipo Temoniera
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
VIM	Metalo-betalactamasas Codificadas por el Integrón Verona

Abreviaturas

Ingles

CG	Clonal group
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPPA	Carbapenemase-producing <i>P. aeruginosa</i>
CRE	Carbapenem-resistant <i>Enterobacterales</i>
CRPA	Carbapenem-resistant <i>P. aeruginosa</i>
HGT	Horizontal Gene Transfer
ICU	Intensive Care Unit
IMP	Imipenemase Metallo- β -lactamases
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MIC	Minimum Inhibitory Concentrations
MGEs	Mobile Genetic Elements
MDR	Multidrug Resistant
MLST	Multilocus Sequence Typing
NDM	New Delhi Metallo- β -lactamase
NICU	Neonatal Intensive Care Unit
NTE _{KPC}	Non-Tn4401 elements
OXA	Oxacilinase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
ST	Sequence Type
TIR	Terminal Inverted Repeats

Abreviaturas

TSD	Target Site Duplication
VIM	Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase
WGS	Whole-Genome Sequencing
XDR	Extensively Drug Resis

RESUMEN

Las infecciones causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes (MDR-del inglés multidrug-resistance) son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, estancias hospitalarias prolongadas y altos costos de atención médica en las unidades de cuidados intensivos (UCI), convirtiéndose así en un serio problema de salud pública a nivel mundial. Es de especial preocupación el desarrollo de la resistencia a carbapenémicos, ya que son los agentes empleados como la última línea de terapia eficaz disponible para el tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacterales*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* MDR. La resistencia a este grupo de antibióticos se puede dar por la combinación de varios mecanismos, entre los que se encuentra la producción de enzimas carbapenemasas, cuyos genes que las codifican pueden estar localizados en elementos genéticos móviles (EGMs), lo que favorece la propagación entre diferentes especies bacterianas, y la transferencia de determinantes de resistencia a otras clases de antibióticos (Capítulo 1).

El panorama de la resistencia en este grupo de microorganismos en Colombia es complejo y, gracias a los múltiples estudios de caracterización molecular de betalactamasas, se ha logrado conocer la prevalencia, las variantes, la distribución y las implicaciones clínicas, en los hospitales de las principales ciudades del país, como es el caso de Medellín, un área de alta endemicidad de bacterias Gram negativas productoras de carbapenemasas (Capítulo 2). Sin embargo, se requiere un seguimiento en regiones cercanas a esta ciudad las cuales no han sido exploradas, que incluya pacientes colonizados por ser fuente importante de propagación de estas bacterias en los hospitales, y de esta manera fortalecer las estrategias de prevención y control de infecciones. Para ello, son

Resumen

necesarios estudios de caracterización molecular de bacterias Gram negativas productoras de carbapenemasas mediante la aplicación de secuenciación de genoma completo, lo cual permita: explorar los genomas de este grupo de bacterias que estén circulando en ésta área del país, identificar las características genéticas relacionadas con resistencia a varios grupos de antibióticos; establecer las relaciones genéticas entre estas, y analizar las dinámicas de transmisión de carbapenemasas entre estos grupos de microorganismos (Cápítulo 3).

En este contexto, se caracterizaron molecularmente aislamientos clínicos de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas provenientes de pacientes infectados y colonizados de tres hospitales de tercer nivel localizados en Medellín y municipios cercanos en Antioquia, Colombia, entre los años 2013 y 2015. En total se recolectaron 232 aislamientos resistentes a carbapenemicos, los cuales fueron analizados mediante PCR para determinar la presencia de genes que codifican para carbapenemasas (*bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* and *bla_{IMP}*). La relación genética entre los aislamientos positivos se evaluó mediante rep-PCR y con estos resultados se seleccionó un subgrupo de aislados para caracterización molecular mediante secuenciación de genoma completo. Se identificaron las características genómicas de *Enterobacteriales* productores de KPC recuperados de pacientes infectados/colonizados y se reconstruyó la dinámica de diseminación del gen *bla_{KPC-2}* usando secuenciación de lecturas largas y cortas. Se encontró que la propagación de *bla_{KPC-2}* entre *Enterobacteriales* en los hospitales participantes se debió a la transferencia horizontal de genes (THG) intra e inter-especies mediada por plásmidos promiscuos, asociados con elementos transponibles lo que originó un brote multiespecie de *Enterobacteriales* productores de KPC en una unidad neonatal de cuidados intensivos. Los plásmidos se detectaron en aislamientos recuperados en otras unidades dentro del mismo hospital y hospitales cercanos (Capítulo 4).

Resumen

Igualmente, se detectó por primera vez en Sur América una metalo-betalactamasa tipo VIM-4 en *Enterobacterales*, en un clon de alto riesgo de *E. coli* (ST471), cuyo gen fue llevado en un plásmido que podría jugar un rol importante en la diseminación de esta enzima en el país (Capítulo 5).

Por otro lado, se caracterizó el contexto genético de *bla*_{VIM-2} y *bla*_{KPC-2} en aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos de pacientes infectados/colonizados en dos de los hospitales de estudio. A través de la secuenciación de genoma completo, se identificó una notable variedad de antecedentes genéticos en los aislados portadores de *bla*_{VIM-2} y *bla*_{KPC-2}, diversidad de integrones de clase 1 y variaciones en los cassettes genéticos asociados a *bla*_{VIM-2}, así como un posible evento de propagación de *bla*_{KPC-2} mediada por un plásmido que contenía parte del Tn440Ib en un caso de infección (Capítulo 6). La epidemia por carbapenemasas de tipo KPC en esta área de alta endemicidad en Colombia es impulsada por la transferencia horizontal de plásmidos promiscuos que albergan *bla*_{KPC-2} entre los miembros de los *Enterobacterales*. Así mismo, la diseminación de *bla*_{VIM-2} y *bla*_{KPC-2} en *P. aeruginosa* en esta área en Colombia ha sido fuertemente influenciada por clones internacionales exitosos, que llevan estos genes y determinantes adicionales de resistencia en elementos genéticos móviles, acompañados por reordenamiento de genes bajo una presión de selección antimicrobiana. Esto enfatiza la necesidad de implementar estrategias de control basadas en el uso racional de antibióticos y convierte la interrupción de la transmisión de plásmidos en un desafío para las intervenciones de salud pública en los países en desarrollo.

ABSTRACT

Infections caused by multidrug-resistant (MDR) Gram-negative bacteria are a leading cause of morbidity and mortality. Prolonged hospital stays and high health care costs in intensive care units (ICUs) are a serious public health problem worldwide. Of particular concern is the development of resistance to carbapenemics, as these are the agents used as the latest line of effective therapy for the treatment of infections caused by MDR *Enterobacterials*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. The resistance to this group of antibiotics can be caused by the combination of several mechanisms, including the production of carbapenemases enzymes. The genes encoding carbapenemases enzymes can be located in mobile genetic elements (MGE), which facilitate the spread between different bacterial species and the transfer of resistance determinants to other classes of antibiotics (Chapter 1).

The spectrum of resistance in this group of microorganisms in Colombia is complex, yet multiple studies of molecular characterization of betalactamases have contributed to elucidate the prevalence, variants, distribution, and clinical implications in the hospitals of Colombia's main cities; such as Medellín, an area with high carbapenemase-producing Gram-negative bacteria endemicity (Chapter 2). However, it is necessary to carry out a surveillance study in regions near this city that have not been explored. This includes the study of colonized patients, because they are an important source of spread of these bacteria in hospitals, and in this way to strengthen prevention and infection control strategies. To this end, studies of molecular characterization of Gram-negative bacteria producers of carbapenemases are required by means of the application of complete genome sequencing. This allows to explore the genomes of this group of bacteria that

Abstract

are circulating in this area of the country; to identify the genetic characteristics related to resistance to several groups of antibiotics; to establish the genetic relations among these and analyzing the dynamics of carbapenemasas transmission among these groups of microorganisms (Chapter 3).

In this context, clinical isolates of Gram-negative bacilli producing carbapenemases from infected and colonized patients from three tertiary level hospitals located in Medellin and nearby municipalities in Antioquia, Colombia, were molecularly characterized between 2013 and 2015. A total of 232 isolates resistant to carbapenemics were collected and analyzed by PCR to determine the presence of genes coding for carbapenemases (*bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} and *bla*_{IMP}). Positive isolates were typed by rep-PCR and with these results a subgroup of isolates was selected for characterization by whole-genome sequencing. The genomic characteristics of KPC-producing *Enterobacteriales* recovered from infected/colonized patients were identified and the dynamics of dissemination of *bla*_{KPC-2} gene using both short and long read sequencing was reconstructed. It was found that the spread of *bla*_{KPC-2} among *Enterobacteriales* in the participating hospitals was due to intra- and interspecies horizontal gene transfer (HGT) mediated by promiscuous plasmids associated with transposable elements that was originated from a multispecies outbreak of KPC-producing *Enterobacteriales* in a neonatal intensive care unit. The plasmids were detected in isolates recovered in other units in the same hospital and nearby hospitals (Chapter 4). Simultaneously, VIM-4 type metallo- β -lactamase in *Enterobacteriales* was detected in a high-risk clone of *E. coli* (ST471) for the first time in South America. The gene was carried in a plasmid that could play an important role in the dissemination of this enzyme in the country (Chapter 5).

Abstract

On the other hand, the genetic context of *bla*_{VIM-2} and *bla*_{KPC-2} in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates from infected/colonized patients in two of the hospitals studied was characterized. Using whole-genome sequencing a remarkable variety of genetic background was identified in the isolates carrying the *bla*_{KPC-2} and *bla*_{VIM-2}. There were a diversity of class 1 integrons and variations in the gene cassettes associated to *bla*_{VIM-2}, as well as a possible event of spread of *bla*_{KPC-2} mediated by a plasmid that containing part of *Tn4401b* in one infection case (Chapter 6). The KPC carbapenemase epidemic in an area of high endemicity in Colombia is driven by the horizontal transfer of promiscuous plasmids harboring *bla*_{KPC-2} among members of the *Enterobacteriales*. Likewise, the dissemination of *bla*_{VIM-2} and *bla*_{KPC-2} in *P. aeruginosa* in this area in Colombia has been strongly influenced by successful international clones, carrying these genes and additional determinants of resistance on mobile genetic elements, accompanied by gene rearrangement under an antimicrobial selection pressure. These emphasizes the need to implement control strategies based on the rational use of antibiotics and makes the interruption of plasmid transmission a challenge for public health interventions in developing countries.

1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 ANTECEDENTES

Las infecciones causadas por bacterias Gram negativas multirresistentes (MDR-del inglés *multidrug-resistance*), particularmente bacilos Gram negativos de la familia de *Enterobacterales* y no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp, son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, estancias hospitalarias prolongadas y altos costos de atención médica en las unidades de cuidados intensivos (UCI), convirtiéndose así en un serio problema de salud pública a nivel mundial (1,2). Estos patógenos están asociados con infecciones severas incluyendo infecciones intraabdominales (IIA), infecciones de tracto urinario (ITU), neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM), infecciones del sitio quirúrgico (ISQ) y bacteriemia (3). Así mismo, se asocian con colonización en pacientes que ocupan centros hospitalarios a largo plazo, lo cual se relaciona con mayor riesgo de infección, convirtiendo a estos pacientes en reservorios y fuente importante de propagación de estas bacterias en los hospitales (4).

Entre los factores más importantes relacionados en la aparición, enriquecimiento y diseminación de bacterias Gram negativas MDR se encuentran el uso inapropiado de antibióticos, la inadecuada aplicación de medidas efectivas de prevención y control como son: la detección precoz, diagnóstico y precauciones de control de infecciones, incluidas las medidas de aislamiento hospitalario, higiene de manos, limpieza y desinfección ambiental (5,6). Igualmente, los mecanismos de resistencia bacteriana que pueden ser expresados intrínsecamente por una especie específica (genes cromosomales) o adquiridos por un subconjunto de cepas por mutación o transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (EGMs), lo que conlleva al incremento dramático de la multirresistencia (7).

1.1 Antecedentes

Las bacterias Gram negativas expresan varios mecanismos de resistencia a los antimicrobianos; algunos favorecen el aumento de la resistencia intrínseca, incluyendo la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos, mutaciones en porinas, enzimas modificadoras y modificaciones de la diana, además, los adquiridos por transferencia horizontal que generan resistencia a múltiples antibióticos (8). Sin embargo, uno de los mecanismos de mayor frecuencia e impacto clínico es la producción de betalactamasas - enzimas capaces de hidrolizar los betalactámicos, familia de antibióticos más empleada para combatir las infecciones bacterianas en el mundo (9). Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las de tipo AmpC y las carbapenemasas, han incrementado en su frecuencia y diseminación a nivel mundial, limitando cada vez más las opciones terapéuticas tanto en infecciones adquiridas en los hospitales como en las que se generan en la comunidad (10). De ellas, las carbapenemasas son una de las mayores amenazas para el tratamiento antimicrobiano, ya que tienen la capacidad de hidrolizar la mayoría de los antibióticos betalactámicos, incluyendo los carbapenémicos que se consideran como el último recurso para el tratamiento de infecciones por bacterias Gram negativas. Además, los genes que las codifican pueden estar localizados en EGM como transposones, integrones y plásmidos lo que favorece su rápida propagación y la transferencia de determinantes de resistencia a otras clases de antibióticos (11).

Los tres grupos de enzimas carbapenemasas responsables de la mayor parte de la resistencia a los carbapenémicos son: *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas (KPC) (clase A de Ambler), metalo-betalactamasas (MBLs) (clase B de Ambler) y las de tipo oxacilinasas como la OXA-48-like (clase D de Ambler) (12). Las enzimas KPC han sido informadas en varios miembros de *Enterobacterales* causando infecciones y grandes brotes hospitalarios; el gen que las codifica

1.1 Antecedentes

bla_{KPC} esta portado en plásmidos y asociado principalmente con el elemento transponible Tn4401. De todas las carbapenemasas en *Enterobacterales* esta tiene mayor distribución a nivel global y sus variantes han sido descritas principalmente en la mayoría de los países Latinoamericanos (13). Igualmente, han sido reportadas en Estados Unidos en casi todos sus estados, en Israel se han reportaron brotes de infección por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC pero las medidas de intervención empleadas han generado una disminución en su prevalencia; en Europa la mayor incidencia de KPC en *Enterobacterales* resistentes a carbapenemicos se encuentra en países Mediterráneos, especialmente en Italia y Grecia, así mismo en Asia, especialmente en China (14).

Dentro de las enzimas MBLs se encuentran las de subclase B1 que contienen el mayor número de miembros clínicamente relevantes, como son la NDM (New Delhi), codificada por el gen *bla_{NDM}* asociado principalmente con múltiples eventos de adquisición independientes por diferentes plásmidos e identificado en *Enterobacterales* y otras bacterias Gram negativas, ampliamente diseminada en India; descrita en China y algunos países de Europa, Latinoamérica y África (14,15). La VIM (metalo-betalactamasas codificadas por el integrón verona) ha sido reportada principalmente en *P. aeruginosa* e identificada predominante en países de Europa y Latinoamérica, mientras que IMP (betalactamasa de clase B que hidroliza imipenem) predomina en Japón y en regiones del sudeste asiático. Los genes que codifican estas dos MBL (*bla_{VIM}* y *bla_{IMP}*, respectivamente) están fuertemente asociados con integrones de clase I que se integran en el cromosoma o en plásmidos (15). Por otra lado, la OXA-48-like es común en *Enterobacterales*, endémicas en el subcontinente indio y en algunos países del África subsahariana; además, están diseminándose fuertemente en ciertos países de Europa (16).

1.1 Antecedentes

La diseminación de bacilos Gram negativos productores de estas carbapenemasas ocurre a un ritmo alarmante, causa brotes hospitalarios y circula no solo en y entre instituciones, sino también en la comunidad, animales y el medio ambiente. Estos han tenido una distribución global y existe una variabilidad sustancial a nivel continental, nacional, regional e incluso entre instituciones hospitalarias (14). El conocimiento de la prevalencia y la incidencia de carbapenemasas en bacilos Gram negativos es fundamental para prevenir su propagación y seleccionar las opciones de prevención y contención. Es así como diferentes estudios de vigilancia y epidemiología molecular a nivel local, nacional y global proporcionan la evidencia necesaria para la toma de decisiones, orientar las medidas efectivas de prevención y control de infecciones y de esta manera establecer protocolos de tratamiento adecuado basados en la epidemiología local de cada país y hospital (17, 18).

En Colombia, los reportes de resistencia a carbapenémicos y detección molecular de diferentes clases de carbapenemasas en *Enterobacterales* y bacilos Gram negativos no fermentadores, se iniciaron a finales de los años noventa por diferentes grupos de vigilancia e investigación, y a partir de esta época diversos estudios demostraron tendencia en el aumento de su frecuencia, convirtiéndose en un país endémico para estas enzimas, lo que ha limitado cada vez más las alternativas terapéuticas (19, 20). El panorama de la resistencia en este grupo de microorganismos en Colombia es complejo y gracias a los múltiples estudios se ha logrado conocer la prevalencia, las variantes, la distribución y las implicaciones clínicas, en los hospitales de las principales ciudades del país. Sin embargo, se requiere realizar un seguimiento en regiones cercanas a estas ciudades las cuales no han sido exploradas, que incluya pacientes colonizados por ser fuente

1.2 Esquema de la tesis

importante de propagación de estas bacterias en los hospitales, y de esta manera fortalecer las estrategias de prevención y control de infecciones.

Por otro lado, un estudio genómico realizado en aislamientos de bacterias productoras de carbapenemasas recuperadas en las principales ciudades del país (21), permitió sugerir que la aparición de resistencia a carbapenémicos en los hospitales colombianos ha sido impulsada por la transferencia horizontal de los genes que codifican para estas enzimas mediante plásmidos entre bacterias Gram negativas, en lugar de la diseminación clonal de cepas de alto riesgo. Estudios de caracterización genómica sobre la dinámica de transmisión de estos genes proporcionarían la evidencia suficiente para determinar los mecanismos de propagación de este grupo de genes en el país, y de esta manera, aportar información para crear adecuadas intervenciones desde el grupo de control de infecciones en los hospitales.

1.2 ESQUEMA DE LA TESIS

Esta tesis se estructura en 9 capítulos. El capítulo 1 contiene una introducción general de los antecedentes de la investigación sobre la diseminación, implicaciones clínicas y vigilancia de bacterias Gram negativas productoras de carbapenemasas. Destaca la importancia de los estudios de caracterización genómica para la vigilancia en pacientes colonizados e infectados, en regiones cercanas a las ciudades principales de Colombia, para comprender la dinámica de transmisión de estas y aportar a los grupos de control de infecciones en los hospitales del país.

1.2 Esquema de la tesis

El capítulo 2 presenta el estado del arte de las variantes, la distribución geográfica y la caracterización molecular de las betalactamasas en Colombia desde finales de la década de los 90 hasta 2016.

El capítulo 3 exhibe el problema de resistencia bacteriana en bacilos Gram negativos en Colombia y la necesidad de realizar el presente estudio de caracterización genómica de bacterias Gram negativas productoras de carbapenemasas en hospitales de Medellín y regiones cercanas.

El capítulo 4 demuestra la dinámica de diseminación de *bla*_{KPC-2} entre *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos en pacientes infectados y colonizados en tres hospitales localizados en un área endémica de Colombia, por la transferencia horizontal de genes (THG) intra e inter-especies mediada por plásmidos promiscuos, lo que originó un brote multiespecie de *Enterobacterales* productores de KPC en una unidad neonatal de cuidados intensivos.

El capítulo 5 describe el primer caso de una metalo-betalactamasa tipo VIM-4 en *Enterobacterales* en Sur América.

El capítulo 6 identifica la variabilidad genómica de aislamientos de *P. aeruginosa* portadores de *bla*_{VIM-2} y *bla*_{KPC-2} en pacientes infectados y colonizados en dos hospitales localizados en un área endémica de Colombia, demuestra la diversidad en los elementos genéticos que portan el gen *bla*_{VIM}, como un posible evento de diseminación de *bla*_{KPC-2} mediada por un plásmido en un caso de infección.

1.2 Esquema de la tesis

El capítulo 7 discute los resultados de esta investigación.

El capítulo 8 contiene las conclusiones de esta investigación.

El capítulo 9 señala los aportes científicos y perspectivas.

La sección de referencias indica las de la introducción, planteamiento del problema y la discusión general.

2

DISTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BETALACTAMASAS EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS EN COLOMBIA, 2001-2016

Rada AM, Hernández-Gómez C, Restrepo E, Villegas MV. Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. Biomédica. 2019;39(Supl.1):199-220.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>

Resumen

Las betalactamasas, enzimas con capacidad hidrolítica frente a los antibióticos betalactámicos, son responsables del principal mecanismo de resistencia en bacterias Gram negativas; las de mayor impacto clínico y epidemiológico en los hospitales, son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las de tipo AmpC y las carbapenemasas. El incremento en su frecuencia y su diseminación a nivel mundial ha limitado cada vez más las opciones terapéuticas tanto en infecciones adquiridas en los hospitales como las que se generan en la comunidad.

En Colombia, las redes de vigilancia y los grupos de investigación iniciaron su estudio desde finales de los años 90 y, así, se logró la caracterización molecular de las diferentes variantes; además, se reportó una gran prevalencia y diseminación en los hospitales de mediana y alta complejidad, y se describió el impacto clínico de las infecciones que causan. Dichos estudios han evidenciado el alto grado de endemia de algunas de estas betalactamasas y, en consecuencia, la necesidad de una inmediata implementación de programas para inducir el uso prudente de los antibióticos y de medidas de vigilancia, que permitan controlar y prevenir su diseminación, con el fin de disminuir la morbimortalidad en los pacientes y preservar las opciones terapéuticas disponibles en la actualidad.

En esta revisión, se recopiló la información sobre las variantes, la distribución geográfica y la caracterización molecular de las betalactamasas en Colombia, así como los estudios llevados a cabo desde finales de la década de 90 hasta el 2016, lo cual permitió tener un panorama de las

2.1 Introducción

betalactamasas que circulan en diferentes regiones, su incremento en el tiempo y sus implicaciones clínicas.

Palabras clave: betalactamasas, bacterias Gram negativas, infecciones bacterianas, programas de optimización del uso de los antimicrobianos, Colombia.

2. 1 INTRODUCCIÓN

Las infecciones por bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos, y su elevada frecuencia tanto en hospitales como en la comunidad, se ha convertido en un problema de salud pública en el mundo debido a su asociación con hospitalizaciones más prolongadas, mayores tasas de fracasos terapéuticos, aumento de la mortalidad y mayores costos de la atención hospitalaria (1-3).

Estas bacterias tienen diferentes mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos, y la producción de betalactamasas es el principal contra la familia de antibióticos más utilizada para combatir las infecciones bacterianas en el mundo (4).

Entre las betalactamasas de mayor impacto clínico, están las de espectro extendido (BLEE), las cuales se han identificado principalmente en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, y son codificadas por genes cromosómicos o plasmídicos (5,6). Las BLEE se definen como betalactamasas capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, una o más oximino-cefalosporinas (en particular, cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidima) y

2.1 Introducción

monobactámicos (aztreonam); una de sus características es ser sensibles a los inhibidores de las betalactamasas, como el ácido clavulánico, el sulbactam, el tazobactam y el avibactam (7,8).

Otras enzimas de importancia clínica son las betalactamasas de tipo AmpC, presentes en algunas enterobacterias y en bacterias Gram negativas no fermentadoras. Estas pueden ser codificadas por genes cromosómicos y presentarse de forma constitutiva o inducible, o ser adquiridas a través de plásmidos. Las enzimas AmpC son capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación y cefamicinas, y se diferencian de las BLEE en que no son sensibles a los inhibidores de las betalactamasas (9).

Por último, las betalactamasas de tipo carbapenemasas se han identificado principalmente en Enterobacteriaceae, en *Acinetobacter baumannii* y en *Pseudomonas aeruginosa*; su codificación puede ser cromosómica o generarse en genes asociados con varios elementos móviles, como los transposones, los integrones y una variedad de plásmidos, lo que permite su rápida diseminación entre las especies y dentro de ellas. Las carbapenemasas tienen un mayor espectro hidrolítico frente a casi todos los antibióticos betalactámicos, incluidos los carbapenémicos (10).

Los reportes sobre la difusión de las betalactamasas se comenzaron a conocer en Latinoamérica a partir de 1990, específicamente sobre las BLEE en enterobacterias, y algunas de las enzimas tuvieron su origen en este continente. Por otro lado, la aparición y la diseminación de las carbapenemasas en las enterobacterias, en *Pseudomonas* spp. y en *Acinetobacter* spp., dejan pocas opciones terapéuticas debido a la multirresistencia que confieren. El aumento de la frecuencia de

2.1 Introducción

los reportes de carbapenemasas en la región, sugiere que se han propagado con éxito y que, incluso, se han hecho endémicas en algunos países (11-13).

En Colombia, los reportes de resistencia se iniciaron a finales de los años noventa, cuando en diversos estudios se demostró un aumento de la frecuencia y la expresión de diferentes tipos de BLEE en *K. pneumoniae* y *E. coli* (14). Posteriormente, se identificaron diferentes clases de carbapenemasas en enterobacterias y bacterias Gram negativas no fermentadoras que, con el tiempo, se diseminaron (15,16).

El panorama de la resistencia de las bacterias Gram negativas en Colombia es complejo. Gracias a los múltiples estudios de caracterización microbiológica y molecular llevados a cabo por diferentes grupos de vigilancia e investigación del país, se ha logrado conocer la prevalencia, las variantes, la distribución y las implicaciones clínicas de las betalactamasas en los hospitales de diferentes ciudades del país.

El propósito de esta revisión de tema fue recopilar la información disponible en la literatura sobre las diferentes clases y tipos de betalactamasas identificadas en bacterias Gram negativas, su incremento en el tiempo, su diseminación y su actual distribución geográfica en Colombia. Para ello, se hizo una búsqueda bibliográfica en las bases de datos PubMed, SciELO y Google Scholar, y se seleccionaron artículos en español e inglés publicados entre 2001 y 2016.

2.2 Clasificación de las betalactamasas

La resistencia a los antibióticos de las bacterias Gram negativas se produce mediante diversos mecanismos, entre los que se pueden mencionar la alteración del sitio blanco de ciertos antibióticos (17), el incremento de la expresión de los sistemas de eflujo (18), la alteración de la permeabilidad de la membrana externa por pérdida de porinas (19) y la producción de enzimas que inactivan los antibióticos, de las cuales las betalactamasas son las más prevalentes (7).

Estas enzimas escinden el enlace amida en el anillo beta-lactámico y se consideran el principal mecanismo de resistencia a la familia de antibióticos betalactámicos (20). Su clasificación se ha basado, tradicionalmente, en su estructura primaria o en sus características funcionales. Por un lado, Ambler las agrupa en cuatro clases moleculares (A a D) con base en la secuencia de aminoácidos (21) y, por el otro, Busch las clasifica en grupos funcionales con base en la inhibición de clases específicas de betalactámicos y en las propiedades de inactivación de los inhibidores de betalactamasas (22).

Entre los grupos funcionales, se encuentra el grupo 1, en el que se ubican las cefalosporinas de clase molecular C (21,22), las cuales son activas contra las cefalosporinas de tercera generación y cefamicinas, como el cefoxitin. Asimismo, usualmente son resistentes a la acción inhibitoria del ácido clavulánico y del sulbactam, y poseen una gran afinidad frente al aztreonam (23,24).

El grupo 2, o de clases moleculares A y D (21,22), incluye las serin- betalactamasas y múltiples subgrupos, de los cuales los de mayor importancia clínica son dos subgrupos de la clase A: las

2.3 Betalactamasas de espectro extendido en Colombia

betalactamasas de espectro extendido, que hidrolizan cefalosporinas de amplio espectro y antibióticos monobactámicos, y son inhibidas por el ácido clavulánico, y las serin-carbapenemasas, con capacidad de hidrolizar toda clase de betalactámicos (25). Las de clase D poseen propiedades de hidrólisis frente a los carbapenémicos (26).

Por último, las betalactamasas que requieren de iones divalentes de cinc, se clasifican en el grupo 3 como metalo-betalactamasas de clase molecular B (21,22) y se diferenciaron inicialmente por su habilidad para hidrolizar carbapenémicos, en contraste con su poca afinidad o capacidad hidrolítica frente a los monobactámicos; además, no son inhibidas por el ácido clavulánico o el tazobactam, pero sí por quelantes de iones de metal como el ácido etilen-diamino-tetraacético o EDTA (27).

2.3 Betalactamasas de espectro extendido en Colombia

Desde el momento en que se detectaron los primeros casos de infecciones por enterobacterias productoras de BLEE en los hospitales latinoamericanos, se ha observado un aumento constante de la prevalencia y del número de estas enzimas, hasta el punto de considerarse endémica la producción de BLEE en *Klebsiella* spp. en Latinoamérica, con altas tasas de infecciones asociadas a la atención en salud en comparación con las de otras regiones del mundo (11).

La expansión de las BLEE se ha dado rápidamente, en especial las del tipo CTX-M, favorecida por la transferencia horizontal de plásmidos y clones exitosos (11). En Colombia, el panorama no difiere del mundial y en diversos estudios se ha evidenciado la tendencia al aumento de la

expresión de CTX-M y su circulación estable, con la expresión simultánea de enzimas de tipo SHV y TEM (14).

2.3.1 Enzimas TEM y SHV

Las betalactamasas de espectro extendido de tipo temoniera (TEM) y la variable de sulfhidrilo (SHV), se derivaron de la sustitución de aminoácidos del grupo de penicilinasas 2b. Las BLEE de tipo TEM se derivaron de los grupos TEM-1 y TEM-2 (28), y las de tipo SHV se derivaron del SHV-1 (29). Son capaces de hidrolizar antibióticos betalactámicos de espectro extendido y son fuertemente inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam. Estas enzimas se han encontrado más frecuentemente en *K. pneumoniae* y *E. coli*, y son codificadas en diferentes plásmidos asociados con otros genes de resistencia a los antibióticos (30). Actualmente, se han descrito 189 variantes alélicas de tipo SHV y más de 200 de tipo TEM (31).

El primer reporte de la enzima SHV en Suramérica se presentó en aislamientos de *K. pneumoniae* de Argentina y Chile en 1988 y 1989, donde se identificaron las variantes de tipo SHV-2 y SHV-5 (32), en tanto que el primer reporte de la TEM se presentó en el 2003 en Argentina, donde se detectaron los tipos TEM-10 y TEM-12 en *K. pneumoniae* (33).

En Colombia, la caracterización de esta familia de enzimas se hizo a partir de aislamientos de *K. pneumoniae* en 2001 y 2002. La betalactamasa SHV-5 fue la más frecuente, con una posible diseminación por transferencia horizontal de plásmidos de conjugación (34).

2.3 Betalactamasas de espectro extendido en Colombia

En 2004, en el estudio de caracterización epidemiológica y molecular llevado a cabo por Villegas, *et al.*, en ocho hospitales de tercer nivel de diferentes ciudades de Colombia, se encontró una alta prevalencia de diversas BLEE en diferentes cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, con tasas similares a las reportadas en otros países latinoamericanos. Además, se detectó un alto nivel de resistencia simultánea a otra clase de antibióticos, lo que sugiere la presencia de otros posibles mecanismos de resistencia (35).

En los estudios posteriores desarrollados en algunas ciudades, se reportaron diversas BLEE de tipo SHV en *K. pneumoniae* y *E. coli*, entre ellas, las SHV-5, SHV-2a y SHV-12, además de algunas enzimas no detectadas previamente en el país, como SHV-86 y SHV-27 (36-41). Asimismo, este tipo de BLEE se reportó en enterobacterias como *Enterobacter cloacae*, originadas en hospitales y en la comunidad (39,42-44). Ciertos aislamientos presentaron diferentes perfiles de plásmidos, combinaciones de enzimas y resistencia a otros antibióticos no betalactámicos (cuadro 1) (figura 1).

2.3.2 Enzimas CTX-M

Las enzimas cefotaximasas (CTX-M) son un tipo de BLEE que no está relacionado con el grupo de las TEM o las SHV. Hidrolizan la cefotaxima y la ceftriaxona con mayor eficacia que a la ceftazidima, y también, hidrolizan la cefepima con gran eficiencia. Se inhiben mejor con el tazobactam que con el ácido clavulánico (45). Estas enzimas de tipo CTX-M han venido reemplazando las variantes TEM y SHV hasta constituirse en el tipo de BLEE más común y de

2.3 Betalactamasas de espectro extendido en Colombia

carácter endémico en una amplia área geográfica, que incluye Latinoamérica, Norteamérica, Asia y Europa (46), y se encuentran tanto en el ámbito hospitalario como en la comunidad (47,48).

Cuadro 1. Betalactamasas reportadas en Colombia, 2001-2016

Familia BLEE/AmpC/ carbapenemasa	Variante de enzima	Bacteria	Año de recolección del aislamiento	Departamento o ciudad	Año de publicación	Referencia
CTX-M-Grupo 1	Variante no identificada	<i>Kpn</i>	2001-2002	Bogotá*	2003	-
TEM SHV	TEM-1 SHV-5	<i>Kpn</i>	2001-2002	Bogotá	2004	34
TEM SHV	Variante no identificada	<i>Kpn</i> <i>Kox</i> <i>Eco</i>	2002	Medellín, Cali y Bogotá	2004	35
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-12	<i>Kpn</i> <i>Kox</i> <i>Eco</i>	2002	Medellín, Cali y Bogotá	2004	52
CTX-M-Grupo 1 CTX-M-Grupo 2	Variante no identificada	<i>Kpn</i> <i>Kox</i> <i>Eae</i> <i>Eco</i>	2004	Bogotá*	2004	-
CTX-M-Grupo 9						
VIM	VIM-8	<i>Paε</i>	1999-2003	Cali	2004	90
VIM	VIM-2	<i>Paε</i>	2004	Barranquilla, Cali y Pereira	2006	16
TEM SHV CTX-M-Grupo 1	Variante no identificada	<i>Ecl</i>	2003	Bogotá	2006	43
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-12	<i>Kpn</i>	2001	Bogotá	2006	53
CTX-M-Grupo 1 CTX-M-Grupo 2	CTX-M-15 CTX-M-2	<i>Enterobacteriaceae</i>	2005	Bogotá	2006	54
SHV KPC	KPC-2	<i>Kpn</i>	2005	Medellín	2006	72
Subgrupo OXA-23	OXA-23	<i>Aba</i>	2004-2005	Bogotá	2006	107
KPC	KPC-2	<i>Paε</i> <i>Cfr</i>	2006	Medellín	2007	73
Subgrupo OXA-23 Subgrupo OXA-51	OXA-23 OXA-51	<i>Aba</i>	2005	Cali, Bogotá, Medellín, Pereira, Bucaramanga y Barranquilla	2007	108
Subgrupo OXA-23 Subgrupo OXA-51	OXA-23 OXA-64 OXA-69	<i>Aba</i>	2004	Bogotá	2008	110
SHV CTX-M-Grupo 1 AmpC	Variante no identificada	<i>Kpn</i> , <i>Eco</i>	2005-2006	Barranquilla, Montería, Cartagena y Sincelejo	2009	38
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-1 CTX-M-12 CTX-M-12a CTX-M-15 CTX-M-60	<i>Enterobacteriaceae</i>	2004-2005	Bogotá	2009	56
SHV	SHV-2 SHV-5 SHV-12 SHV-86	<i>Kpn</i> , <i>Eco</i> <i>Kpn</i>	2001-2003	Barranquilla y Montería	2010	36
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-12	<i>Eclo</i>				
SHV	SHV-2 SHV-12	<i>Kpn</i>	2003-2005	Bogotá	2011	37
CTX-M-Grupo 1	SHV-27 CTX-M-1 CTX-M-12 CTX-M-15 CTX-M-2					
CTX-M-Grupo 2						
TEM	TEM-1	<i>Eco</i>	2010	Cali	2011	57
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-12 CTX-M-12a CTX-M-15					
KPC	KPC-2	<i>Paε</i>	2006-2010	Medellín, Bogotá, Barranquilla, Cali y Pereira	2011	76
KPC	KPC-2 KPC-3	<i>Kpn</i>	2008	Medellín	2011	80

2.3 Betalactamasas de espectro extendido en Colombia

Familia BLEE/AmpC/ carbapenemasa	Variante de enzima	Bacteria	Año de recolección del aislamiento	Departamento o ciudad	Año de publicación	Referencia
VIM	VIM-24	<i>Kpn</i>	2010	Barranquilla	2011	91
TEM	TEM-1	<i>Eclo, Kpn</i>	2009	Medellín, Bogotá, Cali, Bucaramanga, Ibagué, Barranquilla y Pereira	2012	39
SHV	SHV 1 ó 2 SHV-11 SHV-12	<i>Kpn</i> <i>Eclo, Kox, Kpn</i>				
CTX-M-Grupo 1	CTX-M-12 CTX-M-15	<i>Eclo, Kox, Kpn, Sma</i> <i>Kpn</i>				
KPC	KPC-2 KPC-3	<i>Eclo, Eco, Kpn, Sma</i> <i>Kpn</i>				
TEM SHV CTX-Grupo 1 AmpC	CMY-2	<i>Eco, Kpn</i> <i>Kpn</i> <i>Eco, Kpn</i> <i>Eco, Kpn</i>	2011	Valledupar	2012	40
KPC VIM	KPC-2 VIM-2	<i>Pae</i>	2010	Cali	2012	92
Subgrupo OXA-23 Subgrupo OXA-51	OXA-23 OXA-51	<i>Aba</i>	2005-2007	Bogotá	2012	111
Subgrupo OXA-24/40	OXA-72	<i>Api</i>	2010	Cali	2012	114
KPC VIM	KPC-2 VIM-24	<i>Kpn</i>	2010	Cali	2013	15
TEM SHV CTX-M-Grupo 9 KCP	TEM-1 SHV-12 CTX-M-9 KPC-2	<i>Ecl, Sma, Cfr, Eco</i> <i>Ecl, Sma</i> <i>Eco</i> <i>Ecl, Sma, Cfr, Eco</i>	2006-2007	Medellín, Cali y Barranquilla	2013	44
TEM SHV	TEM-1 SHV-2 SHV-5 SHV-12	<i>Eco, Kpn</i> <i>Kpn</i> <i>Eco</i> <i>Kpn, Eco</i>	2011	3 ciudades de Colombia	2013	60
CTX-M-Grupo 1 AmpC KPC	CTX-M-15 CMY-2 KPC-3	<i>Kpn, Eco</i> <i>Eco</i> <i>Kpn</i>				
NMC KPC	NMC-A KPC-2	<i>Ecl</i> <i>Pae</i>	2009 2007-2008	Barranquilla Montería	2013 2013	69 77
NDM	NDM-1	<i>Kpn</i>	2011	Bogotá	2013	99
Subgrupo OXA-23 Subgrupo OXA-51 Subgrupo OXA-58	OXA-23 OXA-51 OXA-58	<i>Aba, Ano</i> <i>Aba</i> <i>Api</i>	2004-2005, 2007, 2009	4 hospitales de Colombia	2013	113
TEM SHV CTX-M-Grupo 1 CTX-M-Grupo 8 KPC	TEM-1 SHV-12 CTX-M-12 CTX-M-8 KPC-2	<i>Kpn</i> <i>Kpn, Eco</i> <i>Kpn</i> <i>Kpn</i>	2008-2009	Villavicencio	2014	41
TEM SHV CTX-M-Grupo 1 CTX-M-Grupo 2 KPC	KPC-3	<i>Kpn</i>	2008-2010	Bogotá	2014	81
KPC		<i>Kpn, Pae</i>	2009-2010	Cali, Medellín, Barranquilla, Ibagué y Pereira	2014	78
IMP	Variante no identificada	<i>Pre</i>	2012-2014	Bogotá	2017	83
GES	Variante no identificada	<i>Citrobacter spp</i> <i>Enterobacter spp</i> <i>Pseudomonas spp</i>	2012-2014	Antioquia, Huila, Valle del cauca, Norte del Santander y Santander Norte del Santander	2017	
Subgrupo OXA-143	OXA-143	<i>Acinetobacter spp.</i>	2012-2014		2017	
KPC VIM	KPC-2 VIM-2	<i>Pae</i>	2012-2014	Medellín	2014	94
NDM		<i>Pre, Mmo, Kpn,</i> <i>Eco, Aha, Sfo,</i> <i>Afa</i>	2014	Bogotá, Antioquia, Santander, Valle del Cauca, Huila y Nariño	2014	101
Subgrupo OXA-23	OXA-23	<i>Aba</i>	2009-2012	Medellín, Barranquilla, Bogotá, Pereira, Ibagué, Neiva, Pasto, Bucaramanga y Cali	2014	112

2.3 Betalactamasas de espectro extendido en Colombia

Familia BLEE/AmpC/ carbapenemasa	Variante de enzima	Bacteria	Año de recolección del aislamiento	Departamento o ciudad	Año de publicación	Referencia
Subgrupo OXA-24/40 Subgrupo OXA-51	OXA-72	<i>Aba</i>	2006	Bogotá	2014	115
KPC	KPC-3	<i>Kpn</i>	2010-2011	Medellín	2015	82
KPC	KPC-2	<i>Pae</i>	2008-2010	Siete ciudades de Colombia	2015	93
VIM	VIM-2					
NDM	NDM-1	<i>Pre</i>	2012-2013	Bucaramanga, Bogotá y Madrid (Cundinamarca)	2017	100
KPC	KPC-2	<i>Kpn</i>	2012-2014	Medellín	2016	79
VIM	KPC-3	<i>Kpn, Ecl</i>				
TEM	VIM-2	<i>Pae</i>				
SHV	TEM-1	<i>Kpn</i>	2012-2014	Medellín	2016	84
CTX-M-Grupo 1	SHV-12					
CTX-M-Grupo 8	CTX-M-15					
KPC	CTX-M-8					
VIM	KPC-2					
NDM	KPC-3					
	Variante no identificada	<i>Eco</i>	2015	Yopal	2016	102
Subgrupo OXA-48	OXA-48	<i>Kox</i>	2015	Medellín	2016	117

* Resumen de trabajo presentado en congreso.

Aba: *A. baumannii*; *Afa*: *A. faecalis*; *Aha*: *A. haemolyticus*; *Ano*: *A. nosocomialis*; *Api*: *A. pittii*; *Cfr*: *C. freundii*; *Eco*: *E. coli*; *Eae*: *E. aerogenes*; *Ecl*: *E. cloacae*; *Kpn*: *K. pneumoniae*; *Kox*: *K. oxytoca*; *Mmo*: *M. morgani*; *Pae*: *P. aeruginosa*; *Pre*: *P. rettgeri*; *Sma*: *S. marcescens*; *Sfo*: *S. fonticola*

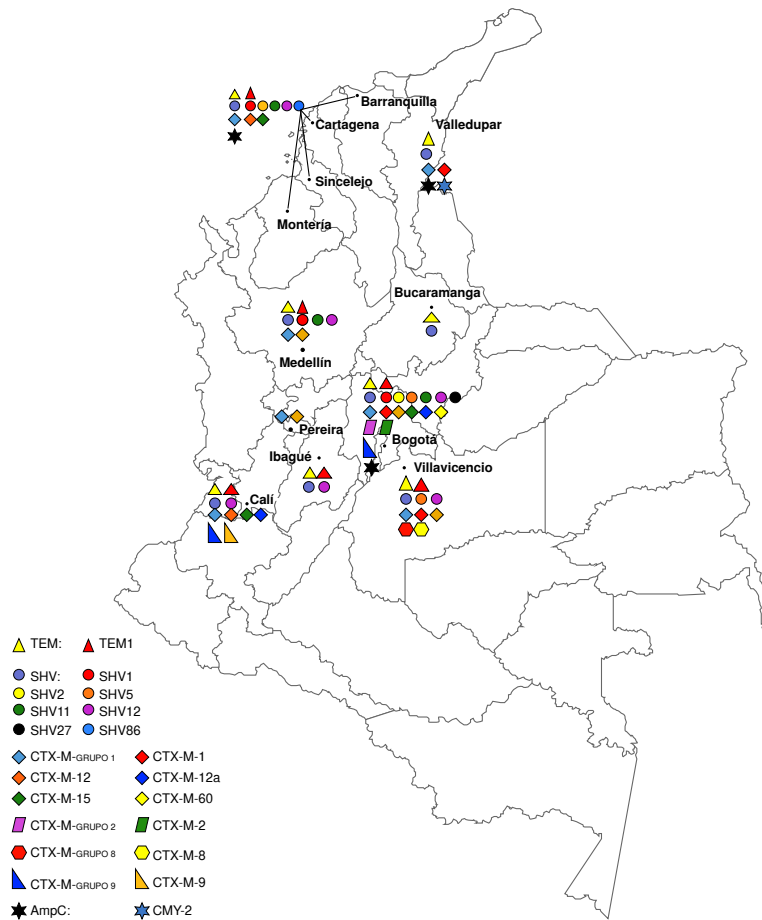


Figura 1. Distribución de BLEE y AmpC en enterobacterias en Colombia

2.3 Betalactamasas de espectro extendido en Colombia

Hasta la fecha, se han identificado 172 variantes diferentes de las CTX-M (31), divididas en cinco grupos con base en la secuencia de aminoácidos que poseen: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25 (49).

Esta familia de enzimas se detectó inicialmente en 1989 en Alemania oriental, en un aislamiento clínico de *E. coli* (50), aunque fue en Suramérica donde comenzaron a identificarse con gran frecuencia, y es posible que hayan estado en constante circulación desde 1989, como lo sugieren Radice, *et al.* (51).

El primer informe de cefotaximasas del grupo CTX-M-1 en Colombia, se dio a conocer en el VI Congreso de Enfermedades Infecciosas (Cartagena, 2003). Posteriormente, se reportó la presencia del gen *bla*_{CTX-M12} en uno de siete aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* recolectados en 2002 (52). En los estudios posteriores en diferentes ciudades del país, se registró una alta prevalencia de la enzima CTX-M-12 en cepas de *K. pneumoniae* causantes de infecciones hospitalarias y se encontró, además, en otro tipo de enterobacterias como *E. coli* y *K. oxytoca* (36-38,53,54) (Mantilla JR, Valenzuela EM, González EB, Méndez EM, Leal AL, Sierra P, *et al.* Alta prevalencia de cefotaximasas del grupo CTX-M-1 en Enterobacteriaceae, asociadas a infección intrahospitalaria en Bogotá. Resumen, IV Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. Infectio. 2004;8:143). Celis, *et al.*, sugirieron que la presencia de este gen, el *bla*_{CTX-M12}, en plásmidos de conjugación de alto peso molecular, fue la causa de su amplia diseminación entre enterobacterias causantes de infecciones hospitalarias en diferentes regiones del país (55).

2.4 Betalactamasas de tipo AmpC en Colombia

Otras cefotaximasas reportadas en *E. cloacae* y *K. pneumoniae* fueron la CTX-M-12a y la CTX-M-15, así como una nueva variante la CTX-M-60, específicamente en *K. pneumoniae* (56), detectadas tanto en aislamientos hospitalarios como de la comunidad. Asimismo, se identificaron la CTX-M del grupo 8 (41) y la CTX-M del grupo 9 (44), con lo cual se demostró la diversidad y la evolución de este tipo de BLEE en el país.

En 2010, se hizo la primera caracterización molecular de cepas de *E. coli* productoras de CTX-M-15 pertenecientes a los clones ST131 y ST405, asociados con infecciones adquiridas en la comunidad (57). El potencial de propagación de estos clones se convirtió en un tema de gran preocupación, ya que existían pocos datos sobre los mecanismos de diseminación y control de bacterias resistentes en la comunidad, lo que incentivó el estudio de la prevalencia, el impacto clínico y los factores de riesgo de infección con este tipo de microorganismos (cuadro 1) (figura 1).

2.4 Betalactamasas de tipo AmpC en Colombia

Las betalactamasas de espectro extendido de tipo AmpC y de clase molecular C, son activas frente a las penicilinas pero aún más activas frente a las cefalosporinas: pueden hidrolizar oximinocefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima y ceftriaxona), cefamicinas (cefroxitin y cefotetan) y monobactámicos (aztreonam), a excepción de las cefalosporinas de cuarta generación (cefepima, cefpiroma) y los carbapenémicos. Además, son resistentes a la combinación de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas, pero son inhibidas por el ácido borónico y la cloxacilina (25).

2.4 Betalactamasas de tipo AmpC en Colombia

Comúnmente, son codificadas en el cromosoma de ciertas enterobacterias y bacterias Gram negativas no fermentadoras y, por lo general, se expresan de manera inducible por la exposición a ciertos betalactámicos. Asimismo, hay especies bacterianas con betalactamasas de tipo AmpC de codificación plasmídica, que pueden ser inducibles o no; sin embargo, *E. coli* presenta un gen *ampC* cromosómico que se expresa de manera constitutiva, además de los genes *ampC* transferidos mediante plásmidos desde otros microorganismos (9,25).

Las betalactamasas de tipo AmpC plasmídicas fueron descritas por primera vez en Suramérica, en Argentina, en la década de los 90, en un aislamiento de *K. pneumoniae* y fueron denominadas como FOX-1 (58). Posteriormente, se informó sobre la betalactamasa AmpC de tipo CMY-2 en *K. pneumoniae*, *Citrobacter koseri* y *Shigella flexneri* (59).

En Colombia, la primera detección fenotípica de betalactamasas de tipo AmpC se hizo en un estudio desarrollado en 2003 en *E. cloacae* y, de los aislamientos encontrados, 60,7 % presentaron betalactamasa AmpC 'desreprimida' y 32,1 % presentaron su forma inducible. En este estudio, se consideró la dificultad para interpretar la prueba fenotípica para estas enzimas y se sugirió la implementación de técnicas moleculares (43).

Entre 2005 y 2006, en hospitales de ciudades de la región Caribe, se reportó la detección molecular del gen *bla*_{AmpC} en aislamientos de *E. coli* y *K. pneumoniae* productores de BLEE (38), así como la de enzimas AmpC de tipo CMY-2 en *E. coli* y *K. pneumoniae* provenientes de pacientes con infección urinaria adquirida en la comunidad (40,60). Uno de los estudios demostró que los aislamientos portadores de betalactamasa AmpC plasmídica de tipo CMY- 2 no presentaban

2.5 Betalactamasas de tipo carbapenemasas en Colombia

relación clonal, por lo cual Leal, *et al.*, sugirieron que su aparición era esporádica y probablemente asociada con brotes. Esta enzima se ha descrito en aislamientos de muestras de origen humano, y en otras de animales de granja o domésticos (60) (cuadro 1) (figura 1).

2.5 Betalactamasas de tipo carbapenemasas en Colombia

Las carbapenemasas representan la familia más versátil de betalactamasas, con capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. Los genes que las codifican están localizados en cromosomas y elementos genéticos como los plásmidos, lo que favorece su rápida propagación y la frecuente transferencia de múltiples genes de resistencia a los antibióticos (61). En la última década, se han convertido en una amenaza real para la salud pública a nivel mundial, ya que afectan la última línea terapéutica de betalactámicos disponibles para el tratamiento de infecciones graves por bacterias Gram negativas (62,63).

Las betalactamasas de tipo carbapenemasas se clasifican en dos grandes grupos según el mecanismo hidrolítico de su sitio activo. El primer grupo de estas betalactamasas lo integran las carbapenemasas que poseen serina y en él se encuentran las carbapenemasas de clase A (serin-carbapenemasas), que incluyen las enzimas IMP/NMC, SME, KPC y GES, y las carbapenemasas de clase D (oxacilinasas), que incluyen la enzima OXA. El segundo grupo es el de las carbapenemasas de clase B del grupo de las metalo-betalactamasas, el cual incluye las enzimas IMP, VIM, GIM, SIM y NDM, que necesitan átomos de cinc como cofactor para ejercer su actividad.

2.5.1 Carbapenemasas de clase A

2.5.1.1 Enzimas NMC-A

Las enzimas NMC-A (no metalo-carbapenemasas de clase A) se identificaron en Francia en 1990, en un aislamiento clínico de *E. cloacae* con resistencia a ampicilina, cefalotina e imipenem, pero con sensibilidad al cefoxitín y a las cefalosporinas de espectro extendido. El gen se codificó en el cromosoma de este microorganismo y difirió de las características fenotípicas de todas las carbapenemasas descritas previamente (64). Posteriormente, en 2003 y 2006, también se identificó en aislamientos de *E. cloacae* en Seattle, Washington y Nueva York (65,66), en el 2004 en Argentina (67), y en el 2012 en Finlandia (68).

El primer reporte en Colombia fue en el 2013, en un aislamiento de *E. cloacae* sensible a las cefalosporinas de espectro extendido, y resistente al cefoxitín y a todos los carbapenémicos (69), hallazgo relevante por ser un nuevo mecanismo de resistencia a los carbapenémicos; además, se encontró que la enzima estaba codificada a nivel cromosómico.

2.5.1.2 Enzimas KPC

Las enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas) son de la clase molecular A y las más prevalentes a nivel mundial. Hidrolizan eficientemente las penicilinas, las cefalosporinas, los monobactámicos y los carbapenémicos; además, son inhibidas por el ácido

2.5 Betalactamasas de tipo carbapenemasas en Colombia

borónico y, parcialmente, por los inhibidores de las betalactamasas, como el ácido clavulánico y el tazobactam (61). Actualmente, se reconocen 23 variantes (31).

La primera variante (KPC-1) fue inicialmente descrita en el 2001 en un aislamiento de *K. pneumoniae* en Carolina del Norte (70). Se diseminó rápidamente mediante plásmidos, y se reportó en otras enterobacterias y en bacterias Gram negativas no fermentadoras (71).

El primer reporte de enzimas KPC en Suramérica lo hicieron Villegas, *et al.*, en el 2005 en Colombia. Estos autores detectaron la variante KPC-2 en dos aislamientos de *K. pneumoniae* de diferentes hospitales de Medellín (72). Posteriormente, en el 2007, apareció el primer reporte en el mundo de la KPC-2 en *P. aeruginosa* en esta misma ciudad (73). En el 2008, se caracterizó el transposón *Tn4401* de estos aislamientos, y se sugirió que constituía un elemento genético involucrado en la movilización del gen *bla_{KPC}* a plásmidos, con capacidad de desplazar el gen de su posición inicial a varias regiones del elemento móvil (74).

En los estudios posteriores, se pudo demostrar que los aislamientos de *K. pneumoniae* productores de la enzima KPC estaban asociados con un clon mayor de linaje genético ST258 y sus variantes cercanas, lo que sugirió que su propagación era internacional. Además, los genes *bla_{KPC}* ubicados en el transposón *Tn4401* estaban presentes en una variedad de plásmidos, lo que facilitó la rápida propagación de la enzima KPC-2 a *K. pneumoniae* y a otras especies bacterianas (75).

2.5 Betalactamasas de tipo carbapenemasas en Colombia

La diseminación de este gen fue reportada en otras especies de enterobacterias y en *P. aeruginosa* en diferentes ciudades del país; el elemento genético móvil, o transposón *Tn4401b*, se caracterizó en algunas enterobacterias (44), lo que planteaba que había surgido tiempo atrás (39,41,76-79).

Otra variante de la enzima KPC, identificada como la KPC-3 en *K. pneumoniae*, causó un primer brote en Colombia. Se estableció que el paciente índice provenía de Israel, lo que evidenció la propagación intercontinental de *K. pneumoniae* productora de KPC-3 (80). Después de este reporte, se demostró que los aislamientos relacionados con el caso índice pertenecían al clon ST512, el cual se integra al complejo clonal 258, lo cual es congruente con estudios previos. Otros hallazgos demostraron la diseminación de la enzima KPC-3 perteneciente al clon ST258 (39,81,82) y su circulación por fuera del ambiente hospitalario en pacientes de diferentes ciudades del país (60). Por ello, Colombia es hoy considerada como una región endémica para las enzimas KPC, con una frecuencia que alcanza el 70,3 % en especies de enterobacterias, según lo ha reportado el grupo de vigilancia del Instituto Nacional de Salud (83).

Recientemente, se publicó un informe sobre la diseminación de la resistencia a los carbapenémicos debida a clones heterogéneos de *K. pneumoniae* no pertenecientes al grupo clonal 258 (GC258) en Medellín, y se sugirió que la transferencia horizontal del gen que codifica para las enzimas KPC ha contribuido a la diseminación de la resistencia a carbapenémicos en este lugar (84) (cuadro 1) (figura 2).

2.5.1.3 Enzimas GES

Los genes que codifican la familia de las betalactamasas de espectro extendido de Guyana (GES), se han detectado principalmente en integrones de clase 1, localizados en plásmidos y reportados en *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y Enterobacteriaceae. La primera enzima GES se detectó en 1998 en un aislamiento de *K. pneumoniae* (GES-1) en un hospital de Francia y, originalmente, se identificó como integrante de la familia de las BLEE por su espectro de hidrólisis contra penicilinas y cefalosporinas de espectro extendido. Sin embargo, la sustitución de aminoácidos específicos del sitio activo de algunas de las variantes de esta enzima, extendió el espectro de su actividad a los carbapenémicos (61).

Actualmente, se reconocen más de 27 variantes de enzimas GES (31). Estas se han reportado en países latinoamericanos como Brasil (GES-5, GES- 16), México (GES-5) y Argentina (GES-2), en *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Serratia marcescens* (13). En Colombia, el Instituto Nacional de Salud reportó por primera vez las enzimas GES en aislamientos de *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., y *Pseudomonas* spp., así como la producción simultánea de KPC más GES y de VIM más GES (83) (cuadro 1) (figura 2).

2.5 Betalactamasas de tipo carbapenemasas en Colombia

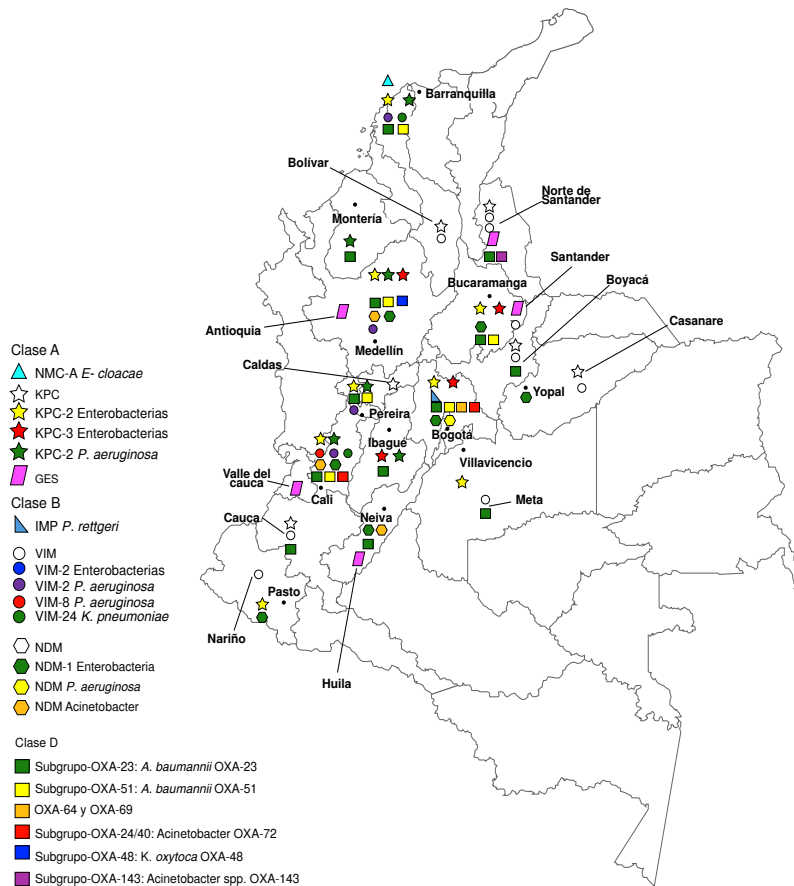


Figura 2. Distribución de carbapenemasas de clase A, B y D en Colombia

2.5.2 Carbapenemasas de clase B

2.5.2.1 Enzimas IMP

La enzima IMP (betalactamasas de clase B que hidroliza imipenem) fue la primera carbapenemasa detectada de la familia de las metalo-betalactamasas en Japón, en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa*; fue identificada en un plásmido de conjugación con un perfil de resistencia a imipenem y a cefalosporinas de espectro extendido (85). Más tarde, en ese mismo país, se identificó en un integrón de *S. marcescens* aislado de un paciente con infección urinaria (86). Las enzimas IMP se han reportado en otros países (61) y ya se han detectado más de 50 variantes (31).

2.5 Betalactamasas de tipo carbapenemasas en Colombia

En Latinoamérica, la primera descripción de una enzima IMP (IMP-1) se hizo en un aislamiento de *K. pneumoniae* multirresistente, tomado de una muestra de sangre de un paciente de 75 años de edad con neumonía asociada a la atención en salud (87). En Colombia, existe un solo reporte de enzimas IMP en un aislamiento de *Providencia rettgeri* en Bogotá (83) (cuadro 1) (figura 2).

2.5.2.2 Enzimas VIM

Entre las carbapenemasas de clase molecular B, se han identificado las enzimas VIM (metalo-betalactamasas codificadas por el integrón verona), las cuales constituyen uno de los más grandes subgrupos de las metalo-betalactamasas de subclase molecular B1 (MLB-B1) (61), de la cual se han descrito 46 variantes (31).

La enzima VIM-1 se detectó por primera vez a finales de los años 90 en el norte de Italia, en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* resistente a los carbapenémicos y asociada con un casete genético insertado en un integrón de clase 1 situado en el cromosoma bacteriano (88). La enzima VIM-2, que comparte el 90 % de identidad con la VIM-1 por los aminoácidos que las componen, es la metalo-betalactamasa más extendida en *P. aeruginosa* y ha sido la fuente de múltiples brotes (89). En Latinoamérica, se ha reportado la enzima VIM-2 en Colombia, Chile, Venezuela, Brasil y Argentina, en aislamientos de *P. aeruginosa* (13).

La primera evidencia de este tipo de enzimas en Colombia se dio a conocer en un estudio realizado entre 1997 y 2003 en Cali, en un brote causado por *P. aeruginosa* productora de la VIM-8 (90). Posteriormente, en el 2006, se detectó la variante VIM-2 en *P. aeruginosa* en varias ciudades de

2.5 Betalactamasas de tipo carbapenemasas en Colombia

Colombia, donde se identificó el gen *bla*_{VIM-2} en algunos clones sobre el mismo integrón y casete genético, así como la presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (16).

Una nueva variante es la enzima VIM-24, identificada en un aislamiento de *K. pneumoniae* en el 2011, documentado como el primer caso de una infección por enterobacterias con metalo-betalactamasas en el país. El gen fue localizado en un integrón de clase 1 y transportado en un plásmido grande, lo que originó la necesidad de estudios posteriores para aclarar su impacto epidemiológico y clínico (91). En un estudio posterior, en el 2013, se detectó la presencia simultánea de la VIM-24 y la KPC-2 en un aislamiento de *K. pneumoniae*, y su codificación en dos plásmidos diferentes, lo que significó nuevas limitaciones en las opciones terapéuticas (15).

También en Colombia, se describió la presencia de las enzimas VIM-2 y KPC-2 en un mismo aislamiento de *P. aeruginosa*, el cual pertenecía al clon ST111, considerado como un clon exitoso responsable de epidemias en todo el mundo (92). La diseminación de este clon de alto riesgo, se reportó en un estudio del 2014, en el que se incluyeron aislamientos de 16 hospitales de tercer nivel en siete ciudades de Colombia, donde casi todos los aislamientos que portaban el gen *bla*_{VIM-2} pertenecían al clon ST111 de *P. aeruginosa* y solo un tipo de secuencia ST235 se asoció con la enzima KPC-2 (93).

Recientemente, en un estudio de aislamientos de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos en cinco hospitales de tercer nivel de Medellín, se evidenció que la frecuencia de los aislamientos productores de la enzima VIM-2 era similar a la de los aislamientos productores de la KPC-2, lo que sugería una rápida difusión de *P. aeruginosa* productora de estas

carbapenemasas. Además, se presentó una estrecha relación genética en los aislamientos dentro de cada hospital, lo que sugería su transmisión intrahospitalaria (94) (cuadro 1) (figura 2).

2.5.2.3 Enzimas NDM

Las enzimas NDM (meta-lobetalactamasas de tipo Nueva Delhi) confieren una alta resistencia a la mayoría de los antibióticos y tienen un gran efecto negativo en los tratamientos. Esta familia de enzimas NDM pertenece a la clase molecular B y comprende 16 variantes (31). Se reportó por primera vez en el 2008 en Nueva Delhi, en un aislamiento de *K. pneumoniae* y *E. coli* recuperado de un paciente sueco. Las enzimas NDM son resistentes a los carbapenémicos y a todos los antibióticos probados, a excepción de la colistina (95). Su diseminación se ha detectado principalmente en enterobacterias y, en menor proporción, en *Acinetobacter* spp. y *P. aeruginosa* (96).

Las enzimas NDM se han reportado en diferentes países de Asia, Europa, África y Norteamérica (97). El primer reporte en Latinoamérica fue en el 2008 en Guatemala, en dos aislamientos de *K. pneumoniae* (98). En Colombia, la enzima NDM-1 se detectó por primera vez en seis aislamientos de *K. pneumoniae* recuperados de un brote que afectó pacientes en una unidad neonatal de Bogotá en el 2011, los cuales pertenecían al clon ST1043 (99).

En los estudios posteriores en diferentes ciudades de Colombia, se demostró la circulación de esta enzima en diferentes bacterias Gram negativas causantes de infecciones asociadas a la atención en salud (100- 102), lo cual evidencia un grave problema para el país, por su capacidad de

diseminación, incluso en la comunidad, y las pocas opciones terapéuticas para tratar a los pacientes infectados (cuadro 1) (figura 2).

2.5.3 Carbapenemasas de clase D

2.5.3.1 Enzimas OXA

Las serin-carbapenemasas de clase D se denominaron enzimas de tipo oxacilinasas (OXA), por su capacidad de hidrolizar la oxacilina y la cloxacilina. Sus genes están integrados en el cromosoma, los plásmidos o los integrones. Además, poseen una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos y se han identificado 498 variantes (31), las cuales se caracterizan porque son poco inhibidas por los inhibidores de las betalactamasas y EDTA (61).

En los años 80, se detectaron aislamientos de *A. baumannii* resistentes a los carbapenémicos debido a la presencia de betalactamasas codificadas en plásmidos y categorizadas como enzimas OXA (103). La primera metalo-betalactamasa de tipo OXA se describió en 1993, de un aislamiento de *A. baumannii* con resistencia a múltiples medicamentos, proveniente de un hospital escocés; posteriormente, se denominó OXA-23 y constituyó un nuevo subgrupo de la familia OXA (104,105). Otro subgrupo es el de la OXA- 51, identificado por primera vez en *A. baumannii* en Argentina en el 2005, el cual correspondía a enzimas codificadas en el cromosoma y, por lo tanto, presentes de forma natural en este microorganismo (106). Además de estos subgrupos, se han reconocido otros, como los OXA-24/40, OXA-58, OXA-48, OXA-143 y OXA-235, en Latinoamérica y el Caribe (13).

2.5 Betalactamasas de tipo carbapenemasas en Colombia

Entre el 2004 y el 2005, en un grupo de aislamientos de *A. baumannii* resistentes a imipenem en una unidad de quemados de Colombia, se detectó el gen *bla*_{OXA-23}, el cual se identificó como un grupo endémico y se estudió durante los diez meses del estudio (107). En el 2007, Villegas, *et al.*, describieron por primera vez la diseminación de la enzima OXA-23 en Suramérica en 66 aislamientos de *A. baumannii* con multirresistencia, todos productores de carbapenemasas de tipo OXA-51 y, 65 de ellos, productores también del tipo OXA-23. La propagación clonal ocurrió entre hospitales de la misma ciudad y entre hospitales de diferentes ciudades (108). Además, se confirmó la presencia de la secuencia de inserción *ISAbal* corriente arriba del *bla*_{OXA-23} y el *bla*_{OXA-51}, lo que puede afectar la expresión de estos genes (108,109).

En ese mismo año, se demostró la incidencia de *A. baumannii* productora de la metalo-betalactamasa OXA-23, al detectarse un clon en varios servicios hospitalarios, lo que evidenció su dispersión y la causa de un brote que duró 10 meses, así como la presencia de otros tipos de carbapenemasas OXA-64 u OXA-69 (subgrupo OXA-51), lo que permitió sugerir que la resistencia de los aislamientos a los carbapenémicos no se ha dado por la expresión conjunta de ambos genes, sino por la sobreexpresión de la carbapenemasa OXA-23 asociada con la presencia de la secuencia de inserción *ISAbal* (110).

En estudios posteriores, se demostró la presencia de aislamientos de *A. baumannii* productores de OXA-23 en otras ciudades de Colombia (111,112), y se reportó por primera vez la carbapenemasa OXA-143 (91). Asimismo, en aislamientos de *A. nosocomialis* productores de la carbapenemasa OXA-23 y se reportó por primera vez en aislamientos de *A. pittii* y *A. baumannii*, la presencia de la OXA-58 y la OXA-72 del subgrupo OXA-24/40 (113-115).

2.5 Betalactamasas de tipo carbapenemasas en Colombia

La carbapenemasa OXA-48, que hidroliza de forma eficiente penicilinas y, debilmente, carbapenémicos, con muy poca actividad contra las cefalosporinas de espectro extendido, se ha reportado principalmente en enterobacterias y se ha detectado cada vez más en muchos países del mundo (116). El primer caso de esta carbapenemasa en Colombia, se registró en el 2016 en un aislamiento de *K. oxytoca* en un hospital de tercer nivel, en un paciente que había sido hospitalizado previamente en dos instituciones diferentes de Medellín y no había viajado a otros países en el año anterior (117). Sin embargo, hasta el momento no se han reportado otros casos de enterobacterias resistentes a los carbapenémicos que produzcan carbapenemasas de tipo OXA-48 en el país (cuadro 1) (figura 2).

En la figura 3, se resume la evolución de las betalactamasas mencionadas a lo largo del manuscrito según su año de aparición en Colombia.

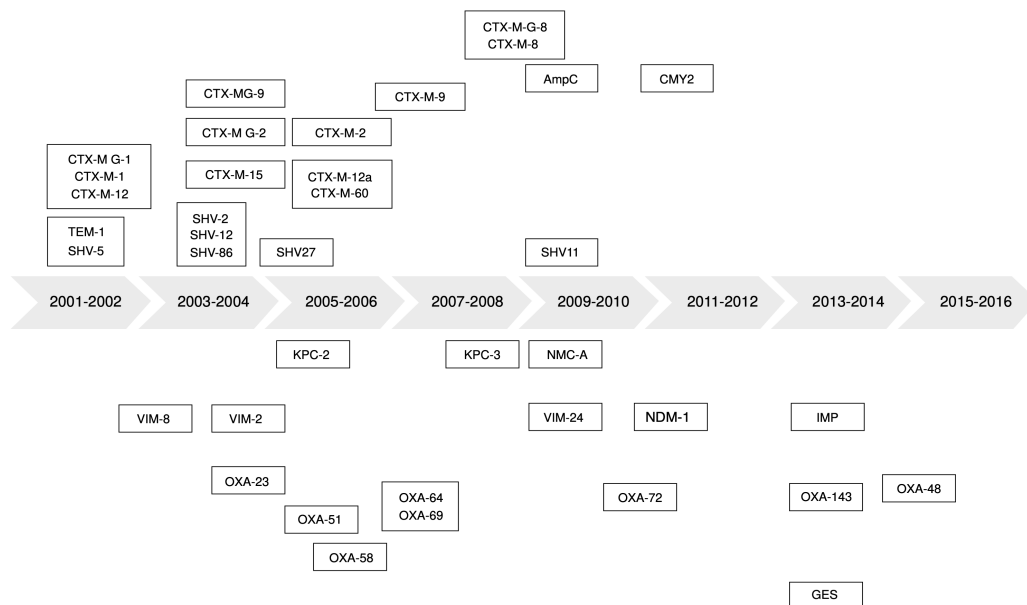


Figura 3. Variantes de BLEE, AmpC y carbapenemasas detectadas en Colombia, 2001-2016

2.6 CONCLUSIÓN

Los estudios de caracterización fenotípica y molecular de la resistencia en enterobacterias, *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. llevados a cabo en varias ciudades de Colombia, han permitido conocer el panorama de la resistencia, la aparición, la circulación y la diseminación de diferentes tipos de betalactamasas, como las BLEE, las AmpC y las carbapenemasas, tanto en hospitales como en la comunidad.

Desde los primeros reportes hasta hoy, se han detectado diferentes variantes de estas enzimas y se ha registrado el aumento de su frecuencia, su rápida propagación y la aparición de clones exitosos. Hay una gran preocupación por la diseminación de carbapenemasas mediante elementos móviles, tanto en enterobacterias como en bacterias Gram negativas no fermentadoras, porque esta limita cada vez más las alternativas terapéuticas y convierte a Colombia en un país endémico para estas enzimas.

De ahí, la necesidad de implementar programas para el uso prudente de los antibióticos en los hospitales del país, de hacer seguimiento ampliado en las ciudades para vigilar su presencia en los hospitales, y de fortalecer las estrategias de prevención y control de infecciones. La detección temprana de estos mecanismos de resistencia, posibilita orientar la elección del mejor tratamiento, contener la diseminación de microorganismos resistentes, y disminuir el costo de la atención, la hospitalización y los fracasos terapéuticos.

2.7 REFERENCIAS

1. Balsalobre LC, Droga M, Matté MH. An overview of antimicrobial resistance and its public health significance. *Braz J Microbiol.* 2014;45:1-5. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014005000033>
2. Paterson DL. Impact of antibiotic resistance in gram-negative bacilli on empirical and definitive antibiotic therapy. *Clin Infect Dis.* 2008;47(Suppl.1):S14-20. <https://doi.org/10.1086/590062>
3. Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Falagas ME. Impact of antimicrobial multidrug resistance on inpatient care cost: an evaluation of the evidence. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11:321-31. <https://doi.org/10.1586/eri.13.4>
4. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci.* 2015;22:90-101. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>
5. Rodríguez I, Thomas K, van Essen A, Schink AK, Day M, Chattaway M, *et al.* Chromosomal location of blaCTX-M genes in clinical isolates of *Escherichia coli* from Germany, The Netherlands and the UK. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43:553-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.02.019>

2.7 Referencias

6. Chouchani C, El Salabi A, Marrakchi R, Abouelkacem N, Walsh TR. Occurrence of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* harboring chromosomally mediated and plasmid-mediated CTX-M-15 β -lactamase in a Tunisian hospital. *Can J Microbiol*. 2012;58:1099-103. <https://doi.org/10.1139/w2012-089>
7. Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care*. 2015;5:61. <https://doi.org/10.1186/s13613-015-0061-0>
8. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, *et al*. CTX-M: Changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59:165-74. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl483>
9. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22:161-82. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
10. Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20:831-8. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12655>
11. Guzmán-Blanco M, Labarca JA, Villegas MV, Gotuzzo E, Latin America Working Group on Bacterial Resistance. Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. *Braz J Infect Dis*. 2014;18:421-33. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.10.005>

2.7 Referencias

12. Casellas JM. Antibacterial drug resistance in Latin America: Consequences for infectious disease control. *Rev Panam Salud Pública*. 2011;30:519-28. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892011001200004>
13. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;20:1-21. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268918>
14. González L, Cortés JA. Systematic review of antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from Colombian hospitals. *Biomédica*. 2014;34:180-97. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.1550>
15. Rojas LJ, Mojica MF, Blanco VM, Correa A, Montealegre MC, De la Cadena E, *et al*. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coharboring KPC and VIM carbapenemases in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:1101-2. <https://doi.org/10.1128/AAC.01666-12>
16. Villegas M, Lolans K, del Rosario-Olivera M, Suárez CJ, Correa A, Queenan AM, *et al*. First detection of metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:226-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.226-229.2006>

2.7 Referencias

17. Ruiz LJ. Mechanisms of resistance to quinolones: Target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51:1109-17.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkg222>
18. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.* 2004;64:159-204.
<https://doi.org/10.2165/00003495-200464020-00004>
19. Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. Insertional inactivation of oprD in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;236:137-43. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09639.x>
20. Jacoby GA, Muñoz-Price LS. The new beta-lactamases. *N Engl J Med.* 2005;352:380-91.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra041359>
21. Ambler RP. The structure of b-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289:321-31. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
22. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1211-33.
<https://doi.org/10.1128/AAC.39.6.1211>
23. Bush K. β -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clin Microbiol Rev.* 1988;1:109-23.
<https://doi.org/10.1128/CMR.1.1.109>

2.7 Referencias

24. Bush K, Freudenberg JS, Sykes RB. Interaction of azthreonam and related monobactams with β -lactamase from gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;22:414-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.22.3.414>
25. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:969-76. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
26. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57:373-83. <https://doi.org/10.1093/jac/dki482>
27. Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santucci P, Meunier C, de Pauw E, *et al.* Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:902-6. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.902>
28. Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis.* 1988;10:879-84.
29. Tzouvelekis LS, Bonomo RA. SHV-type β -lactamases. *Curr Pharm Des.* 1999;5:847-64.

2.7 Referencias

30. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:933-51. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>.
31. Lahey Clinic. β -lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. Fecha de consulta: 15 de febrero de 2017. Disponible en: <https://www.lahey.org/studies/>
32. Casellas JM, Goldberg M. Incidence of strains producing extended spectrum beta- lactamases in Argentina. *Infection.* 1989;17:434-6. <https://doi.org/10.1007/BF01645567>
33. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, *et al.* Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:3554-60. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3554-3560.2003>
34. Espinal PA, Mantilla JR, Saavedra CH, Leal AL, Alpuche C, Valenzuela EM. Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido. *Biomédica.* 2004;24:252-61. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i3.1271>

2.7 Referencias

35. Villegas MA, Correa A, Pérez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn JP, *et al.* Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004;49:217-22. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.03.001>
36. Espinal P, Garza-Ramos U, Reyna F, Rojas-Moreno T, Sánchez-Pérez A, Carrillo B, *et al.* Identification of SHV- type and CTX-M-12 extended- spectrum β -lactamases (ESBLs) in multiresistant enterobacteriaceae from Colombian Caribbean hospitals. *J Chemother.* 2010;22:160-4. <https://doi.org/10.1179/joc.2010.22.3.160>
37. Pulido I, Mantilla J, Valenzuela E, Reguero M, González E. Distribución de genes codificadores de β -lactamasas de espectro extendido en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* de hospitales de Bogotá, D.C., Colombia. *Biomédica.* 2011;31:15-20. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i1.331>
38. Gaitán S, Espinal P, Grupo de Investigación en Resistencia Bacteriana Región Caribe. Caracterización molecular de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas de espectro extendido en hospitales de la región Caribe, Colombia. *Rev Chil Infect.* 2009;26:239-246. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182009000400006>
39. Mojica MF, Correa A, Vargas DA, Maya JJ, Montealegre MC, Rojas LJ, *et al.* Molecular correlates of the spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Colombia. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;40:277-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.05.006>

2.7 Referencias

40. Martínez, P, Garzón D, Máttar S. CTX-M-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from community-acquired urinary tract infections in Valledupar, Colombia. Braz J Infect Dis. 2012;16:420-5. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.05.001>
41. Martínez P, Sánchez L, Máttar S. Carbapenemase KPC-2 in ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from two clinics from Villavicencio, Colombia. Braz J Infect Dis. 2014;18:100-1. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.09.002>
42. García IA, Valenzuela EM, Saavedra CH, Leal AL, Eslava J, Mantilla JR. Caracterización molecular de aislamientos de *Enterobacter cloacae* multirresistentes, productores β -lactamasas provenientes de pacientes de un hospital de tercer nivel de Bogotá. Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. 2005;53:148-59.
43. González E, Valenzuela E, Mantilla J, Leal A, Saavedra C, Eslava J. Resistencia a cefepime en aislamientos de *Enterobacter cloacae* provenientes de hospitales de Bogotá, Colombia. Rev Salud Pública. 2006;8:191-9. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642006000200007>
44. Cuzon G, Naas T, Correa A, Quinn JP, Villegas MV, Nordmann P. Dissemination of the KPC-2 carbapenemase in non-*Klebsiella pneumoniae* enterobacterial isolates from Colombia. Int J Antimicrob Agents. 2013;42:59-62. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.04.002>

2.7 Referencias

45. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -Lactamases: A clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18:657-86. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
46. Bonnet R. Growing group of extended spectrum b-lactamases: The CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:1-14. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004>
47. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: An emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 2008;8:159-66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0)
48. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, *et al.* Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. J Antimicrob Chemother. 2008;61:273-81. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm464>
49. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. Int J Med Microbiol. 2010;300:371-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.005>
50. Rasmussen JW, Hoiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases. Can J Microbiol. 2004; 50:137-65. <https://doi.org/10.1139/w03-111>

2.7 Referencias

51. Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:602-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.602-604.2002>
52. Villegas MV, Correa A, Pérez F, Zuluaga T, Radice M, Gutkind G, *et al.* CTX-M-12 β -lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:629-31. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.629-631.2004>
53. Mantilla JR, Reguero MT, González E, García I, Leal A, Espinal P, *et al.* Caracterización molecular de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de CTX-M-12 en la unidad de cuidado intensivo neonatal de un hospital colombiano. *Biomédica.* 2006;26:408-14. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i3.359>
54. Valenzuela EM, Mantilla JR, Reguero MT, González EB, Pulido IY, Llerena ID, *et al.* Detection of CTX-M-1, CTX-M-15, and CTX-M-2 in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bogotá, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1919-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1919-1920.2006>
55. Celis Y, Pulido I, Valenzuela-de Silva E, Reguero M, Mantilla J. Ambiente genético del gen *bla*CTX-M-12 en aislamientos hospitalarios de *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Colomb Biotecnol.* 2009;11:48-58.

2.7 Referencias

56. Mantilla JR, Barreto E, Reguero MT, Velandia DA. Identifying cefotaximase genes in *Enterobacteriaceae* hospital isolates by PCR-SSCP. *Rev Colomb Biotechnol.* 2009;11:57-65.
57. Ruiz SJ, Montealegre MC, Ruiz-Garbajosa P, Correa A, Briceño DF, Martínez E, *et al.* First characterization of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clones causing community-onset infections in South America. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1993-6. <https://doi.org/10.1128/JCM.00045-11>
58. González LM, Pérez-Díaz JC, Ayala J, Casellas JM, Martínez-Beltrán J, Bush K, *et al.* Gene sequence and biochemical characterization of FOX-1 from *Klebsiella pneumoniae*, a new AmpC-type plasmid-mediated beta-lactamase with two molecular variants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:2150-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.9.2150>
59. Rapoport M, Monzani V, Pasteran F, Morvay L, Faccone D, Petroni A, *et al.* CMY- 2-type plasmid-mediated AmpC beta-lactamase finally emerging in Argentina. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31:385-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.11.016>
60. Leal AL, Cortés JA, Arias G, Ovalle MV, Saavedra SY, Buitrago G, *et al.* Emergence of resistance to third generation cephalosporins by *Enterobacteriaceae* causing community-onset urinary tract infections in hospitals in Colombia. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:298-303. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.04.007>

2.7 Referencias

61. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440-58. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
62. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:1099-106. <https://doi.org/10.1086/592412>
63. Marchaim D, Chopra T, Pérez F, Hayakawa K, Lephart PR, Bheemreddy S, *et al.* Outcomes and genetic relatedness of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at Detroit medical center. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2011;32:861-71. <https://doi.org/10.1086/661597>
64. Nordmann P, Mariotte S, Naas T, Labia R, Nicolas MH. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37:939-46. <https://doi.org/10.1128/AAC.37.5.939>
65. Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. NmCA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:999-1002. <https://doi.org/10.3201/eid0908.030096>
66. Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial

2.7 Referencias

- Surveillance Program (2000-2004). *Microb Drug Resist.* 2006;12:223-30.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2006.12.223>
67. Radice M, Power P, Gutkind G, Fernández K, Vay C, Famiglietti A, *et al.* First class A carbapenemase isolated from Enterobacteriaceae in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1068-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.1068-1069.2004>
68. Osterblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: The first years (2008-11). *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2860-4. <https://doi.org/10.1093/jac/dks299>
69. Blanco VM, Rojas LJ, De La Cadena E, Maya JJ, Camargo RD, Correa A, *et al.* First report of a nonmetallo-carbapenemase class A carbapenemase in an *Enterobacter cloacae* isolate from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:3457.
<https://doi.org/10.1128/AAC.02425-12>
70. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sánchez A, Biddle JW, Steward CD, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1151-61.
<https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>

2.7 Referencias

71. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009;9:228-36. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
72. Villegas M, Lolans K, Correa A, Suárez JC, López JA, Vallejo M, *et al.* First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:2880-2. <https://doi.org/10.1128/AAC.00186-06>
73. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, López JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:1553-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.01405-06>
74. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:1257-63. <https://doi.org/10.1128/AAC.01451-07>
75. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, *et al.* Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:1349-56. <https://doi.org/10.3201/eid1609.091389>

2.7 Referencias

76. Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing beta-lactamase *blaKPC-2* gene in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:5350-3. <https://doi.org/10.1128/AAC.00297-11>
77. Buelvas FA, Díaz MA, Muñoz AB, Tovar C. Aislamiento clínico de *Pseudomonas aeruginosa* productor de KPC-2 en la ciudad de Montería, Córdoba, Colombia. *Infectio.* 2013;17:35-8.
78. Pacheco R, Osorio L, Correa A, Villegas MV. Prevalencia de bacterias Gram negativas portadores del gen *blaKPC* en hospitales de Colombia. *Biomédica.* 2014;34(Supl.1):81-90. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1642>
79. Vanegas JM, Parra OL, Jiménez JN. Molecular epidemiology of carbapenem resistant gram-negative bacilli from infected pediatric population in tertiary - care hospitals in Medellín, Colombia: An increasing problem. *BMC Infect Dis.* 2016;16:463. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1805-7>
80. López JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Briceño DF, *et al.* Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:52-6. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03209.x>
81. Rodríguez E, Saavedra Y, Leal A, Álvarez C, Olarte N, Valderrama A, *et al.* Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. *Biomédica.* 2014;34(Supl.1):224-31. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1696>

2.7 Referencias

82. Ocampo AM, Vargas CA, Sierra P, Cienfuegos AV, Jiménez J. Caracterización molecular de un brote de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos en un hospital de alto nivel de complejidad de Medellín, Colombia. *Biomédica*. 2015;35:496-504. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i4.2610>
83. Ovalle MV, Saavedra SY, González MN, Hidalgo AM, Duarte C, Beltrán M. Resultados de la vigilancia nacional de la resistencia antimicrobiana de enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores en infecciones asociadas a la atención de salud, Colombia, 2012-2014. *Biomédica*. 2017;37:473-85. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i4.3432>
84. Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos AV, Roncancio G, Chavda KD, Kreiswirth BN, *et al*. A two-year surveillance in five Colombian tertiary care hospitals reveals high frequency of non-CG258 clones of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with distinct clinical characteristics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:332-42. <https://doi.org/10.1128/AAC.01775-15>
85. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35:147-51. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.1.147>
86. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, *et al*. Molecular characterization of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia*

2.7 Referencias

- marcescens* that shows imipenem resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1994;38:71-8.
<https://doi.org/10.1128/AAC.38.1.71>
87. Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. J Clin Microbiol. 2005;43:516-9. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.516-519.2005>
88. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, *et al.* Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1584-90. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.7.1584>
89. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: The quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 2005;18:306-25. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005>
90. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. J Clin Microbiol. 2004;42:5094-101. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5094-5101.2004>

2.7 Referencias

91. Montealegre MC, Correa A, Briceño DF, Rosas NC, De La Cadena E, Ruiz SJ, *et al.* Novel VIM metallo-beta-lactamase variant, VIM-24, from a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:2428-30. <https://doi.org/10.1128/AAC.01208-10>
92. Correa A, Montealegre MC, Mojica MF, Maya JJ, Rojas LJ, De La Cadena EP, *et al.* First report of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate coharboring KPC and VIM carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:5422-3. <https://doi.org/10.1128/AAC.00695-12>
93. Correa A, Del Campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodríguez-Baños M, Perez F, *et al.* Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:2421-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.03926-14>
94. Vanegas JM, Cienfuegos AV, Ocampo AM, López L, del Corral H, Roncancio G, *et al.* Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2014;52:3978-86. <https://doi.org/10.1128/JCM.01879-14>
95. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla(NDM-1)*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:5046-54. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>

2.7 Referencias

96. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int.* 2014;2014:249856. <https://doi.org/10.1155/2014/249856>
97. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1791-8. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>
98. Pasteran F, Alborno E, Faccone D, Gómez S, Valenzuela C, Morales M, *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1795-7. <https://doi.org/10.1093/jac/dks101>
99. Escobar-Pérez JA, Olarte-Escobar NM, Castro-Cardozo B, Valderrama-Márquez IA, Garzón-Aguilar MI, Martínez-de la Barrera L, *et al.* Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:1957-60. <https://doi.org/10.1128/AAC.01447-12>
100. Saavedra-Rojas SY, Duarte-Valderrama C, González-de Arias MN, Ovalle-Guerro MV. Emergence of *Providencia rettgeri* NDM-1 in two departments of Colombia, 2012-2013. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2017;35:354-8. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.05.011>

2.7 Referencias

101. Instituto Nacional de Salud. Circulación de carbapenemasas tipo Nueva Delhi metalo-betalactamasa (NDM) en Colombia 2012-2014. Bogotá, D.C.: INS; 2014.
102. Correa C, Castro E, Salamanca D, Bustacara L, Lemos E. *Escherichia coli* productora de Nueva Delhi metalo-b-lactamasa en Colombia: reporte de caso. Infectio. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2016.05.002>
103. Evans BA, Amyes SG. OXA β -Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2014;27:241-63. <https://doi.org/10.1128/CMR,00117-13>
104. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents. 1993;2:81-7. [https://doi.org/10.1016/0924-8579\(93\)90045-7](https://doi.org/10.1016/0924-8579(93)90045-7)
105. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:196-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.1.196-199.2000>
106. Brown S, Young HK, Amyes SG. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. Clin Microbiol Infect. 2005;11:15-23. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01016.x>

2.7 Referencias

107. Pinzón JO, Mantilla JR, Valenzuela EM, Fernández F, Álvarez CA, Osorio E. Caracterización molecular de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* provenientes de la unidad de quemados de un hospital de tercer nivel de Bogotá. *Infectio*. 2006;10:71-8.
108. Villegas MV, Kattan JN, Correa A, Lolans K, Guzmán AM, Woodford N, *et al.* Dissemination of *Acinetobacter baumannii* clones with OXA-23 carbapenemase in Colombian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:2001-4. <https://doi.org/10.1128/AAC.00226-07>
109. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, *et al.* The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;258:72-7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x>
110. Saavedra SY, Núñez JC, Pulido IY, González EN, Valenzuela EM, Reguero MT, *et al.* Characterisation of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus*--*A. baumannii* complex isolates in a third-level hospital in Bogotá, Colombia. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31:389-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.12.008>
111. Martínez P, Máttar S. Imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the *ISAbal-bla*_{OXA-23,51} and *ISAbal-bla* ADC-7 genes in Montería, Colombia. *Braz J Microbiol*. 2012;43:1274-80. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000400006>

2.7 Referencias

112. Hernández-Gómez C, Blanco VM, Motoa G, Correa A, Maya JJ, de la Cadena E, *et al.* Evolución de la resistencia antimicrobiana en bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica.* 2014;34(Supl.1):91-100. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1667>
113. Reguero MT, Medina OE, Hernández MA, Flórez DV, Valenzuela EM, Mantilla JR. Antibiotic resistance patterns of *Acinetobacter calcoaceticus-A. baumannii* complex species from Colombian hospitals. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:142-6. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.07.013>
114. Montealegre MC, Maya JJ, Correa A, Espinal P, Mojica MF, Ruiz SJ, *et al.* First identification of OXA-72 carbapenemase from *Acinetobacter pittii* in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:3996-8. <https://doi.org/10.1128/AAC.05628-11>
115. Saavedra SY, Cayô R, Gales AC, Leal AL, Saavedra CH. Early dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* strain in Colombia: A case report. *Braz J Infect Dis.* 2014;18:678-80. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2014.05.017>
116. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1597-606. <https://doi.org/10.1093/jac/dks121>

2.7 Referencias

117. Vanegas JM, Ospina WP, Felipe Higueta-Gutiérrez L, Natalia Jiménez J. First reported case of an OXA-48-producing isolate from a Colombian patient. *J Glob Antimicrob Resist.* 2016;6:67-8. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.04.001>

3

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

3.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años, se ha informado un aumento en las infecciones causadas por bacterias Gram negativas MDR lo que representa un desafío para la salud pública a nivel mundial. Este grupo de bacterias causan alrededor de 700.000 muertes cada año en todo el mundo y se estima que podría ocasionar 10 millones de muertes para el 2050, con una alta pérdida de recursos económicos (1). Los pacientes asistidos en las UCI tienen un alto riesgo de colonización e infección por estas bacterias, las cuales se seleccionan en estos pacientes por la exposición prolongada de la microbiota a la presión de antibióticos de amplio espectro o por la transferencia nosocomial (2). Es de especial preocupación el desarrollo de la resistencia a carbapenémicos, ya que son los agentes empleados como la última línea de terapia eficaz disponible para el tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* MDR. La resistencia a este grupo de antibióticos se puede dar por la combinación de varios mecanismos, siendo la producción de carbapenemasas el mecanismo principal de resistencia para este grupo de antibióticos (3).

La evidencia sugiere que la diseminación clonal de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas ha jugado un papel importante en brotes hospitalarios, los cuales aumentan los costos, la morbilidad y hospitalización. Sin embargo, los genes que codifican estas enzimas pueden estar localizados en EGM como transposones, integrones y plásmidos, lo que favorece la propagación entre especies bacterianas diferentes y la transferencia de determinantes de resistencia a otras clases de antibióticos; esto genera un panorama complejo para el control efectivo de la resistencia a los antibióticos y desafíos significativos para la vigilancia en la salud pública (4). Por

3.1 Planteamiento del problema

ello, son fundamentales los estudios de vigilancia y epidemiología molecular mediante técnicas de secuenciación de próxima generación para comprender las dinámicas de transmisión de estos genes entre bacterias Gram negativas, incluyendo la secuenciación de genoma completo mediante tecnología de lectura corta y larga para el análisis de EGM (5).

En Colombia, la detección molecular de diferentes clases de carbapenemasas en *Enterobacterales* y bacilos Gram negativos no fermentadores, se inició a finales de los años noventa por diferentes grupos de vigilancia e investigación. A partir de esta época diversos estudios demostraron una tendencia en el aumento de su frecuencia, convirtiéndolo en un país endémico para estas enzimas, lo que ha limitado cada vez más las alternativas terapéuticas. La mayoría de las investigaciones se centran en el estudio de bacterias Gram negativas recuperadas de pacientes infectados para la detección de grupos de genes implicados en la resistencia a betalactámicos, la relación genética de los aislamientos que los portan y la identificación de clones exitosos que circulan con mayor frecuencia en el país y la aparición de otros. Sin embargo, teniendo en cuenta la seriedad del problema de resistencia bacteriana a los antibióticos en Colombia, específicamente en Medellín y regiones cercanas, los métodos de detección molecular empleados en estudios anteriores pueden ser limitados para comprender los mecanismos de resistencia y su diseminación en el tiempo.

Por lo anterior, se requiere estudios de caracterización que apliquen adicionalmente técnicas de próxima generación como es la secuenciación de genoma completo, lo cual permitirá explorar los genomas de las bacterias Gram negativas multirresistentes que están circulando en el país, para comprender de esta forma las características genéticas relacionadas con resistencia a varios grupos de antibióticos, así como el análisis de las dinámicas de transmisión de carbapenemasas entre estos

3.2 Justificación

grupos de microorganismos, las cuales han sido propuestas en estudios iniciales de genómica en algunos *Enterobacterales* en el país. Asimismo, incluir el estudio genómico de aislamientos obtenidos de los programas de vigilancia para la detección precoz de colonización por bacterias Gram negativas MDR, ya que este es considerado un factor de riesgo para la adquisición posterior de infecciones y constituye una de las principales vías de propagación de bacterias en las instituciones hospitalarias.

3.2 JUSTIFICACIÓN

En Colombia, los reportes de resistencia a carbapenémicos y detección molecular de carbapenemasas en *Enterobacterales* y bacilos Gram negativos no fermentadores están centrados en los hospitales de las principales ciudades del país, como es Medellín, un área reconocida como endémica para estas enzimas. Sin embargo, se requiere realizar un seguimiento en regiones cercanas a esta ciudad, las cuales no han sido exploradas, y cuentan con centros de atención que pueden ser posibles focos de propagación y reservorios de este grupo de microorganismos, como son los municipios de Rionegro y Bello, ciudades intermedias que son centros de referencia de otros municipios con atención de población de áreas rurales. Además, es conveniente que en los estudios se incluyan pacientes colonizados por ser fuente importante de diseminación de estas bacterias a nivel inter e intrahospitalario, y, de esta manera, fortalecer las estrategias de prevención y control de infecciones. Así mismo, la secuenciación del genoma completo de las bacterias Gram negativas multirresistentes circulantes permitirá comprender las características genéticas asociadas con resistencia a varios grupos de antibióticos, así como el análisis de las dinámicas de transmisión de carbapenemasas entre estos grupos de microorganismos.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 Objetivo General

Caracterizar molecularmente aislados clínicos de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas provenientes de centros hospitalarios de tres municipios de Antioquia entre los años 2013-2015

3.3.2 Objetivos específicos

- Describir las características moleculares y el perfil de susceptibilidad de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas aislados de pacientes infectados y colonizados.
- Describir las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes de los cuales se aislaron bacilos Gram negativos resistentes a carbapenemicos.
- Determinar las relaciones genéticas existentes entre aislados clínicos productores de carbapenemasas de las tres instituciones del estudio.
- Describir las características genéticas relacionadas con resistencia a antibióticos mediante la secuenciación de genoma completo.

4

DYNAMICS OF *bla*_{KPC-2} DISSEMINATION FROM
Non-CG258 *Klebsiella pneumoniae* TO OTHER
Enterobacterales VIA IncN PLASMIDS
IN AN AREA OF HIGH ENDEMICITY

Rada AM, De La Cadena E, Agudelo C, Capataz C, Orozco N, Pallares C, Dinh AQ, Panesso D, Ríos R, Diaz L, Correa A, Hanson BM, Villegas MV, Arias CA, Restrepo E. Dynamics of *bla*_{KPC-2} dissemination from non-CG258 *Klebsiella pneumoniae* to other *Enterobacterales* via IncN plasmids in an area of high endemicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64:e01743-20.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01743-20>

Abstract

Carbapenem-resistant *Enterobacteriales* (CRE) pose a significant threat to global public health. The most important mechanism for carbapenem resistance is the production of carbapenemases. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) represents one of the main carbapenemases worldwide. Complex mechanisms of *bla*_{KPC} dissemination have been reported in Colombia, a country with a high endemicity of carbapenem resistance. Here, we characterized the dynamics of dissemination of *bla*_{KPC} gene among CRE infecting and colonizing patients in three hospitals localized in a highly endemic area of Colombia (2013 and 2015). We identified the genomic characteristics of KPC-producing *Enterobacteriales* recovered from patients infected/colonized and reconstructed the dynamics of dissemination of *bla*_{KPC-2} using both short and long read sequencing. We found that spread of *bla*_{KPC-2} among *Enterobacteriales* in the participating hospitals was due to intra- and interspecies horizontal gene transfer (HGT) mediated by promiscuous plasmids associated with transposable elements that was originated from a multispecies outbreak of KPC-producing *Enterobacteriales* in a neonatal intensive care unit. The plasmids were detected in isolates recovered in other units within the same hospital and nearby hospitals. The gene “epidemic” was driven by IncN-pST15-type plasmids carrying a novel Tn4401b structure and non-Tn4401 elements (NTE_{KPC}) in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., and *Citrobacter* spp. Of note, *mcr-9* was found to coexist with *bla*_{KPC-2} in species of the *Enterobacter cloacae* complex. Our findings suggest that the main mechanism for dissemination of *bla*_{KPC-2} is HGT mediated by highly transferable plasmids among species of *Enterobacteriales* in infected/colonized patients, presenting a major challenge for public health interventions in developing countries such as Colombia.

4.1 Introduction

Keywords: *Klebsiella pneumoniae* non-CG258, *Enterobacterales*, bla_{KPC-2} , Colombia, whole-genome sequencing, IncN plasmid, outbreak.

4.1 INTRODUCTION

Carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) currently pose a significant threat to global public health because the resulting infections are associated with high morbidity and mortality and very limited treatment options (1). In addition, the widespread transmission of carbapenem resistance via mobile genetic elements remains a main reason for concern (2). The most important mechanism for carbapenem resistance is the production of carbapenemases. Indeed, the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) constitutes the most common class A beta-lactamase enzyme. KPC circulates worldwide and, along with New Delhi metallo- β -lactamase (NDM class B), Verona integron-encoded metallo- β -lactamase (VIM class B), imipenemase metallo- β -lactamases (IMP class B), and oxacillinase-48 (OXA-48 class D), is the most common carbapenemase identified worldwide (3, 4).

Since the first case of KPC identified in a *K. pneumoniae* clinical isolate from North Carolina in 1996 (5), international spread has occurred, and multiple outbreaks have been reported worldwide. In particular, a single clonal group (CG), designated CG258, has been responsible for the majority of infections, with two principal sequence types (STs) ST258 and ST512 (a single locus variant of ST258) representing the majority of bla_{KPC} -containing *K. pneumoniae*. CG258 is responsible for >80% of outbreak isolates in the United States and about 90% of infections in Israel (6–9). The allelic variants bla_{KPC-2} and bla_{KPC-3} are the predominant genes associated with *K. pneumoniae* in

4.1 Introduction

Europe (Greece and Italy), Middle East (Israel), South America (Colombia and Argentina), and North America (especially the United States) (6–13). The *bla*_{KPC} gene is often located on the mobile transposon Tn4401 and also on diverse plasmids, including broad-host-range plasmids of the incompatibility groups IncA/C, IncL/M, and IncN (14). Outbreaks of KPC-producing *Enterobacteriales* caused by transferable plasmids have also been reported, specifically, by “promiscuous” plasmids of incompatibility group N (IncN) that harbor the *bla*_{KPC-2} gene (15).

In South America, the first detection of *bla*_{KPC} on a conjugative plasmid was reported in Colombia (16), and since then, the country has become a region where strains producing carbapenemases are endemic (17). In Colombia, outbreaks of KPC-producing *K. pneumoniae* were initially attributed to strains belonging to clonal group CG258 (12, 13). Previous published data also suggested cocirculation of *K. pneumoniae* CG258 strains carrying *bla*_{KPC-3} and non-CG258 (from different STs) harboring *bla*_{KPC-2} (18, 19). However, a recent comprehensive genomic study indicated that the likely emergence of carbapenem resistance in Colombian hospitals was driven by the horizontal transfer of promiscuous plasmids harboring *bla*_{KPC-2} among Gram-negative bacteria instead of clonal dissemination of CG258 strains (19).

Here, we characterized the dynamics of transmission of *bla*_{KPC} genes among CRE infecting and colonizing patients in an area of endemicity in Colombia around the city of Medellín, encompassing more than 2 million inhabitants. We provide evidence that the major mechanism for the spread of carbapenemase resistance (*bla*_{KPC-2}) is the horizontal gene transfer (HGT) mediated by highly transferable plasmids, leading to a high endemicity of carbapenem resistance among *Enterobacteriales*.

4.2 MATERIALS AND METHODS

4.2.1 Strain selection and clinical and epidemiological characterization

We conducted a prospective surveillance study of CRE in three tertiary-care hospitals in Colombia between 2013 and 2015. Hospital 1 is located in Medellín and, hospitals 2 and 3 are located in surrounding areas (202, 143, and 146 beds, respectively). All hospitals have functional intensive care units (ICU) for adults and two of them have neonatal intensive care units (NICU).

We isolated *Enterobacterales* from infected or colonized patients. Colonization was defined as a CRE recovered from a surveillance rectal culture (only in two hospitals) or a clinical sample without associated symptoms or disease. Infection was defined by a compatible clinical syndrome with confirmation by the infectious disease services and/or infection control committee, retrospectively. Rectal swabs were cultured on a selective chromogenic medium (chromID CARBA; bioMérieux). The collected *Enterobacterales* exhibited nonsusceptibility to at least one carbapenem (imipenem, meropenem or ertapenem). Multiple CRE isolates from an individual patient, in the same or different specimens, were also included.

Surveillance rectal swabs were collected in the following patients: (i) individuals with previous stay in the ICU, (ii) patients who received broad-spectrum antibiotic treatment (piperacillin-tazobactam, cefepime, quinolones, or carbapenems) within 90 days before admission, (iii) immunosuppressed patients due to hematologic disease or cancer, (iv) patients who underwent kidney transplantation, (v) use of a long-term urinary catheter or surgical wound drainage, (vi)

4.2 Materials and methods

suspected infection at a different institution, and (vii) hemodialysis and peritoneal dialysis. Clinical and demographic data from colonized and infected patients (i.e., age, sex, colonization or infection by more than one CRE, ICU admission, antibiotic use, use of invasive medical devices, underlying diseases, and comorbidities) were collected from electronically medical records and recorded in a Microsoft Access Database. This study was approved by the Institutional Review Board (IRB) of each participating hospital.

4.2.2 Bacterial identification, antibiotic susceptibility testing, and detection of the *bla*_{KPC} gene

Identification and antimicrobial susceptibility of *Enterobacterales* were performed by using the automated Vitek-2 system (bioMérieux Marcy-l'Étoile, France). The antimicrobial agents tested included ertapenem, imipenem, meropenem, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, gentamicin, amikacin, and ciprofloxacin. MICs results were interpreted following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints (20).

All isolates classified as carbapenem-resistant were tested by PCR for the presence of the *bla*_{KPC} gene using primers and assays previously described (5). *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 were used as positive and negative controls for the PCR assay, respectively. DNA sequencing was performed on PCR amplification products and the results were compared and aligned with reference sequence using the online BLAST database for detection of variants of the *bla*_{KPC} gene.

4.2.3 Whole-genome sequencing

A total of 72 isolates of CRE carrying *bla*_{KPC} were selected for whole-genome sequencing (WGS) based on initial characterization by rep-PCR/DiversiLab (bioMérieux Marcy- l'Étoile, France) and choosing representatives strains of major clonotypes. Genomic DNA was extracted with the GeneJET Genomic DNA purification kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). DNA libraries were prepared using a NexteraXT DNA sample preparation kit and multiplexed with a NexteraXT index primer kit on the Illumina platform (Illumina, San Diego, CA). Genomic libraries were sequenced on a MiSeq sequencer to obtain 250-bp paired-end reads using kit v2 and v3 (Illumina). The readings were processed to eliminate low quality bases and contamination with sequences of adapters and later assembled by *de novo* assembly. Cleaning and assembly were carried out using CLC Genomics Workbench assembler, version 8.5. The genomes were annotated using the RAST server (<http://rast.nmpdr.org>).

In order to reconstruct a fully closed plasmid sequence from a *Klebsiella pneumoniae* isolate carrying the *bla*_{KPC-2} and isolated from hospital 1, we used the MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) platform to obtain long-read sequences. Genomic DNA was extracted using the DNeasy blood and tissue kit (Qiagen), and MinION libraries were prepared using the SQK-LSK208 kit according to the manufacturer's protocol. We used both Illumina and MinION reads to fully generate the plasmid sequence. The BLAST Ring Image Generator (BRIG) (21) was used to align the assembled reads of the sequenced clinical isolates and the transconjugant Tc_C1-205 strain to the *bla*_{KPC-2} carrying *K. pneumoniae* C1-94 plasmid (pIncN_C1-94_KPC) (accession number “contig_241_1” within WGS genome SAMN07291374). In addition, we aligned the

4.2 Materials and methods

assembled reads of some isolates sequenced to the reference plasmids carrying *bla*_{KPC} included pEC881_KPC (accession number CP019026.1) and pBK15692 (accession number NC_022520).

4.2.3.1 *In silico* MLST, genome annotation, virulence factors, and capsular typing

The assemblies were typed on the web server of the Center for Genomic Epidemiology using the multilocus sequence typing (MLST; MLST 2.0 server; <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) (22). The determination of resistance elements, the plasmid replicon, and plasmid multilocus sequence type (pMLST) were identified using Resfinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), Plasmidfinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>), and pMLST 2.0, (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/pMLST/>), respectively (23, 24), using an identity percentage higher than 95% and a coverage cutoff greater than 90%. The Tn4401 isoforms were determined by BLASTn comparing the region surrounding each *bla*_{KPC} gene to the sequences of the Tn4401 isoforms as described previously (25).

In addition, we identified virulence genes and capsular typing (*wzi* sequencing) of isolates of *K. pneumoniae* using the Institut Pasteur's Klebsiella BigsDB site (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

4.2.3.2 Phylogenetic analyses

The phylogenetic reconstruction of the isolates was carried out by detecting single nucleotide polymorphisms (SNP) against reference genomes specific to each family of *Enterobacterales*:

4.2 Materials and methods

Klebsiella spp (accession number NZ_LAKK01000012.1), *Escherichia coli* (accession number CP010876.1), *Citrobacter freundii* (accession number NZ_CP011612.1), *Enterobacter complex* (accession number NRIS01000001.1), and *Serratia marcescens* (accession number NZ_HG326223.1). We also included the following reference genomes as an external group: *E. coli* K-12 MG1655 (accession number NC_000913), *Escherichia fergusonii* ATCC 35469 (accession number NC_011740.1), and *Salmonella enterica* CT18 (accession number NC_003198.1). An SNP matrix was constructed and used to reconstruct the phylogeny of the strains with RAxML (26). We used the general time reversal model with a GAMMA distribution and the Lewis correction for the parameters to determine the best phylogenetic reconstruction by maximum likelihood because the SNP matrix constitutes a matrix without invariant characters. We performed 20 runs and chose the one with the best score. In addition, 100 bootstraps were made to support the reconstructions. The trees obtained were visualized by iTOL (27).

4.2.4 Transferability of the *bla*_{KPC} gene and plasmid analysis

We selected one isolate of *K. pneumoniae* (C1-205) from hospital 1 carrying the *bla*_{KPC} gene (according to short-read WGS-base analysis) and used it as donor in a conjugation experiment, with sodium azide-resistant *E. coli* strain J53 as the recipient. The experiments were performed as previously described (28). Briefly, donor and recipient were grown overnight with agitation at 37°C in tryptic soy broth (TSB). Cultures were transferred into fresh TSB (ratio 1:100) and incubated with agitation for approximately 5 h at 37°C, until the culture reached exponential growth (i.e., an optical density at 600 nm of 0.5 to 0.6). Donor and recipient cultures were mixed at a 1:10 ratio in fresh TSB and incubated at 37°C without agitation for 20 h. The conjugation

4.2 Materials and methods

mixture was diluted in phosphate-buffered saline, and dilutions were plated on tryptic soy agar (TSA) containing imipenem (4 µg/ml) and azide (150 µg/ml) for selection of transconjugants. The conjugation efficiency was calculated by dividing the number of transconjugant by donor cells. Antimicrobial susceptibility testing and PCR amplification of *bla*_{KPC} gene were subsequently performed to confirm the transconjugant Tc_C1-205.

To confirm the localization of *bla*_{KPC-2} gene on a plasmid, we selected eight isolates of different *Enterobacteriales* of hospitals 1 and 2 carrying *bla*_{KPC} genes (C1-70, C1-83, C1-93, C1-94, C1-143, C1-134, C1-205, and C2-116) based on short-read WGS analysis and the *E. coli* transconjugant (Tc_C1-205). S1 digestion and pulsed-field gel electrophoresis was performed using the previously described protocol (29, 30), followed by Southern hybridization using a digoxigenin (DIG) DNA-labeled *bla*_{KPC} probe (DIG-High Prime DNA labeling and detection starter kit II; Roche, Germany), following the manufacturer's instructions. A transconjugant (Tc_C1-205) was sequenced on the Illumina MiSeq platform (Illumina), and the reads were assembled *de novo* using CLC Genomics Workbench assembler (v8.5) with default parameters, and the contigs were mapped against *Escherichia coli* J53 reference genome (accession number AICK01). Identification of plasmids associated with transfer of the *bla*_{KPC} gene was performed with BLASTn, using the unmapped contig harboring *bla*_{KPC} in *E. coli* Tc_C1-205 (accession number SAMN12815781).

Data availability. The sequence data for the isolates included in this study were submitted to the NCBI GenBank database under BioProject number PRJNA391501.

4.3 RESULTS

4.3.1 Infection/colonization by KPC-producing *Enterobacteriales* in neonates and adults

Between July 2013 and August 2015, 185 CRE clinical isolates of infected and colonized patients were collected from three hospitals serving the Medellín metropolitan area and adjacent communities (Central area of Colombia). Among the recovered organisms, 131 (70.8%) were positive for *bla*_{KPC} (based on PCR), with 125 (95.4%) and 6 (4.6%) isolates carrying *bla*_{KPC-2}, and *bla*_{KPC-3}, respectively. These isolates were obtained from a group of 110 patients, encompassing 58 (53%) adults, 51 (46%) newborns, and one infant patient (1%) (see Data Set S1 in the supplemental material).

Among adult patients, 27 (47%) were colonized and 31 (53%) were considered infected. A total of 6 infected patients were previously colonized by KPC-producing *Enterobacteriales*. More than half of the patients were males (56.9%, $n = 33$) and the majority were older (median age of 61 years; interquartile range [IQR] = 48 to 79 and 70 years; IQR = 56 to 81 years in colonized and infected patients, respectively). In the infected patients, KPC-producing *Enterobacteriales* were most frequently isolated from urine and respiratory samples (32.3 and 25.8%, respectively). Overall, patients exhibited several underlying conditions, among which diabetes (34.5%), chronic obstructive pulmonary disease (20.7%), and chronic kidney disease (20.7%) were the most common. A total of 14 (24.1%) patients had previous antibiotic exposure. The most frequent antibiotics were cephalosporins (13.8%), beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combination and carbapenems (10.3% for each) (see Table S1 in the supplemental material).

4.3 Results

Among newborns, 46 (90.2%) were colonized, and 5 (9.8%) were infected by KPC-producing *Enterobacterales*. In colonized newborns, the mean length of hospital stay before sampling was 12 days (IQR = 5 to 30 days). A total of 26.1% ($n = 12$) were premature, and 36.9% ($n = 17$) had been previously exposed to antibiotics, mainly to aminoglycosides (26.1%), aminopenicillins (26.1%), and cephalosporins (23.9%). Several patients were colonized by up to 2 ($n = 7$) or 3 ($n = 1$) different species of *Enterobacterales* (see Table S2).

A total of 48 neonates (45 colonized and 3 infected) were involved in an outbreak that occurred during the study period in the neonatal intensive care unit (NICU) in hospital 1. Indeed, on 7 March 2014, 11 cases of CRE colonization in newborns were detected in the weekly surveillance cultures. Overall, 82 and 7 newborns, respectively, were colonized and infected by CRE and linked to the outbreak, which was declared over on 30 December 2014. Subsequently, five sporadic cases of colonization by carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* were detected between January and August 2015.

4.3.2 Non-CG258 *K. pneumoniae* in the outbreak setting shared an IncN plasmid

Of the 57 isolates previously identified as carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, 51 (89.5%) and 6 (10.5%) were positive for bla_{KPC-2} and bla_{KPC-3} , respectively (see Data Set S1). Of these, 29 isolates were selected for WGS ($n = 23/bla_{KPC-2}$, $n = 6/bla_{KPC-3}$) based on initial characterization by rep-PCR/DiversiLab. The majority ($n = 25$) were identified as *K. pneumoniae*, 3 were identified as *Klebsiella quasipneumoniae*, and 1 was identified as *Klebsiella variicola*.

4.3 Results

The KPC-2-producing *K. pneumoniae* isolates involved in the neonatal outbreak in hospital 1 (in 2014), exhibited a variety of genetic backgrounds that were not related to CG258. One main lineage was ST502 ($n = 10$) harboring capsular type *wzi* 50. Other isolates belonged to ST140 ($n = 2$), ST36 ($n = 1$), and ST101 ($n = 1$) exhibiting different capsular types (*wzi* 306, 394, and 29, respectively) and virulence factors. Despite the major differences in genetic backgrounds the isolates harbored a similar IncN plasmid replicon type and carried *bla*_{SHV}, *sulI*, *fosA*, and *aac(6')*-*Ib-cr* conferring, respectively, β -lactam, sulfonamide, fosfomycin, and aminoglycoside/quinolone resistance (Fig. 1 and Table 1). In addition, the *bla*_{KPC-2} gene was located on a novel Tn440Ib transposon, which was flanked by a GATCT target site duplication and modified by the insertion of the Tn5403 element which was flanked by 34-bp inverted repeats into the ISKpn6 element (see Fig. S1 in the supplemental material).

We also detected *bla*_{KPC-2} in non-CG258 *K. pneumoniae* (ST15, -17, -25, -433, and -964; Fig. 1) from colonized and infected adults in the participating hospitals (2013 to 2015). Some isolates that belonged to ST15 and ST17 (C1-205 and C1-01) carried *bla*_{KPC-2} on the novel Tn440Ib. Of note, we found similar resistance genes and plasmid replicons (IncN) to that found in isolates that had been involved in the NICU outbreak (Fig. 1 and Table 1). In particular, a *K. pneumoniae* ST433 (C1-201-2) isolate carried *bla*_{KPC-2} on a non-Tn440I genetic element (NTE_{KPC}) of Tn3 elements- Δ *bla*_{TEM}-*bla*_{KPC-2}- Δ Tn1721, previously described (31). This isolate carried five plasmid replicons, including IncN and genes conferring resistance to several antibiotics, including sulfonamides, rifampin, trimethoprim, aminoglycosides, and quinolones (Table 1).

4.3 Results

Furthermore, *K. variicola* (C1-76) and *K. quasipneumoniae* (C2-116) isolates recovered from colonized adults at hospital 1 and hospital 2, also carried the *bla*_{KPC-2} on the novel Tn440Ib. We also identified the IncN plasmid replicon and resistance determinants similar to those isolates from the neonatal outbreak (Fig. 1 and Table 1). Overall, our results suggest that the spread of *bla*_{KPC-2} across different clones of *K. pneumoniae* non-CG258, *K. variicola*, and *K. quasipneumoniae* strains was due to the same IncN type conjugative plasmid that carried the gene *bla*_{KPC-2} into the modified Tn440Ib via insertion of a Tn5403 element. This plasmid seems to have the ability to broadly disseminate between hospitals.

4.3.3 Simultaneous circulation of *K. pneumoniae* CG258 harboring *bla*_{KPC-3} favors dissemination of carbapenem resistance

Phylogenetic analyses showed four CG258 *K. pneumoniae* isolates that harbored *bla*_{KPC-3}. They belonged to ST512 (C1-184-1, C1-169-2, and C1-168) and ST258 (C1-78). All of them contained the *wzi* 154 capsular type and were recovered from infected and colonized adult patients from a single hospital (Fig. 1). In the ST258 isolate, *bla*_{KPC-3} was located on a Tn440Ib transposon, and we were able to identify virulence factors, such as type 3 fimbriae, yersiniabactin, and colibactin, as well as five plasmid replicons, including IncI2 (Fig. 1 and Table 1). A BLAST analysis indicated high similarity to an IncI2 plasmid previously described in US isolates and to a *K. pneumoniae* isolate from Colombia (COL-Kpn48) (19, 32) (see Fig. S2). In contrast, the *bla*_{KPC-3} of ST512 isolates was located on a Tn440Ia transposon and contained only the type 3 fimbriae (Fig. 1). We also identified a set of four plasmid replicons that were shared, including the IncFIB(pQIL) plasmid replicon (two isolates, C1-168 and C1-169-2) (Table 1). Of note, the IncFIB(pQIL)

4.3 Results

plasmid is similar to a ST512 strain previously associated with an outbreak in the city of Medellin (19). Thus, our findings suggest that carbapenem-resistant *K. pneumoniae* CG258 isolates are also circulating concomitantly with non-CG258 *K. pneumoniae*, favoring the dissemination of carbapenem resistance.

4.3.4 Interspecies transmission of IncN plasmids carrying *bla*_{KPC-2} carbapenemase

During the sampling period, we collected 74 isolates from species other than *K.pneumoniae* carrying *bla*_{KPC-2} in colonized/infected neonates and adults (see Data Set S1). In total, 43 of these isolates were selected for WGS based on initial characterization by rep-PCR/DiversiLab. The organisms identified were *Escherichia coli* ($n = 12$, 7 STs), *Enterobacter cloacae* complex (including *Enterobacter hormaechei* [$n = 11$, 5 STs, 1 new ST], *Enterobacter cloacae* [$n = 4$, 1 ST], *Enterobacter kobei* [$n = 3$, 1ST], *Enterobacter asburiae* [$n = 1$, 1 ST], and a recently described species of *Enterobacter chengduensis* [$n = 1$, 1 ST] [33]) (Fig. 1), *Citrobacter freundii* ($n = 4$, 3 STs, 1 new ST), *Citrobacter portucalensis* ($n = 1$), and *Serratia marcescens* ($n = 6$) (see Fig. S3).

Most isolates carried genes conferring resistance to several antibiotics, including aminoglycosides, sulfonamides, tetracyclines, trimethoprim, quinolones, phenicols, fosfomycin, and β -lactams (Table 1). Notably, two isolates of *Enterobacter cloacae* complex (*E. kobei* ST32 and *E. hormaechei* ST200) harbored the *mcr-9* gene, related to resistance to polymyxins (33) (Table 1). Of note, the genetic environment of *mcr-9* was similar to the one found in the chromosome of *E. hormaechei* strain S5 (accession number CP031571.1) recovered in the United States in 2015 (35) (see Fig. S4).

4.3 Results

The *bla*_{KPC-2} gene was located on the Tn440Ib isoform in 25/43 isolates sequenced. The remaining isolates carried the novel Tn440Ib, including six *E. coli* isolates (ST349 [*n* = 4] and ST131 [*n* = 2]) (Fig. 1). The non-Tn440I element (NTE_{KPC}) found in *K. pneumoniae* ST433 (see above) was also detected in two *E. coli* isolates (ST131 and ST1236). In *E. hormaechei* ST1396 and *E. asburiae* ST252, NTE_{KPC} was identified with a insertion of Tn5403 into the *tnpA*(Tn3). Of note, these isolates shared the IncN plasmid replicon (Table 1). In *E. coli* ST405 (*n* = 1) and *E. hormaechei* ST116 (*n* = 4), ST66 (*n* = 2), and ST141 (*n* = 1), *bla*_{KPC-2} was not detected in the genome, suggesting the loss of the plasmid or *bla*_{KPC} gene during storage or subculture processing prior to sequencing.

Taken together, our results support interspecies dissemination of *bla*_{KPC-2} among *Enterobacterales* driven by promiscuous plasmids, predominantly of the incompatibility N group (IncN) carrying a novel Tn440Ib structure and non-Tn440I elements (NTE_{KPC}).

4.3 Results

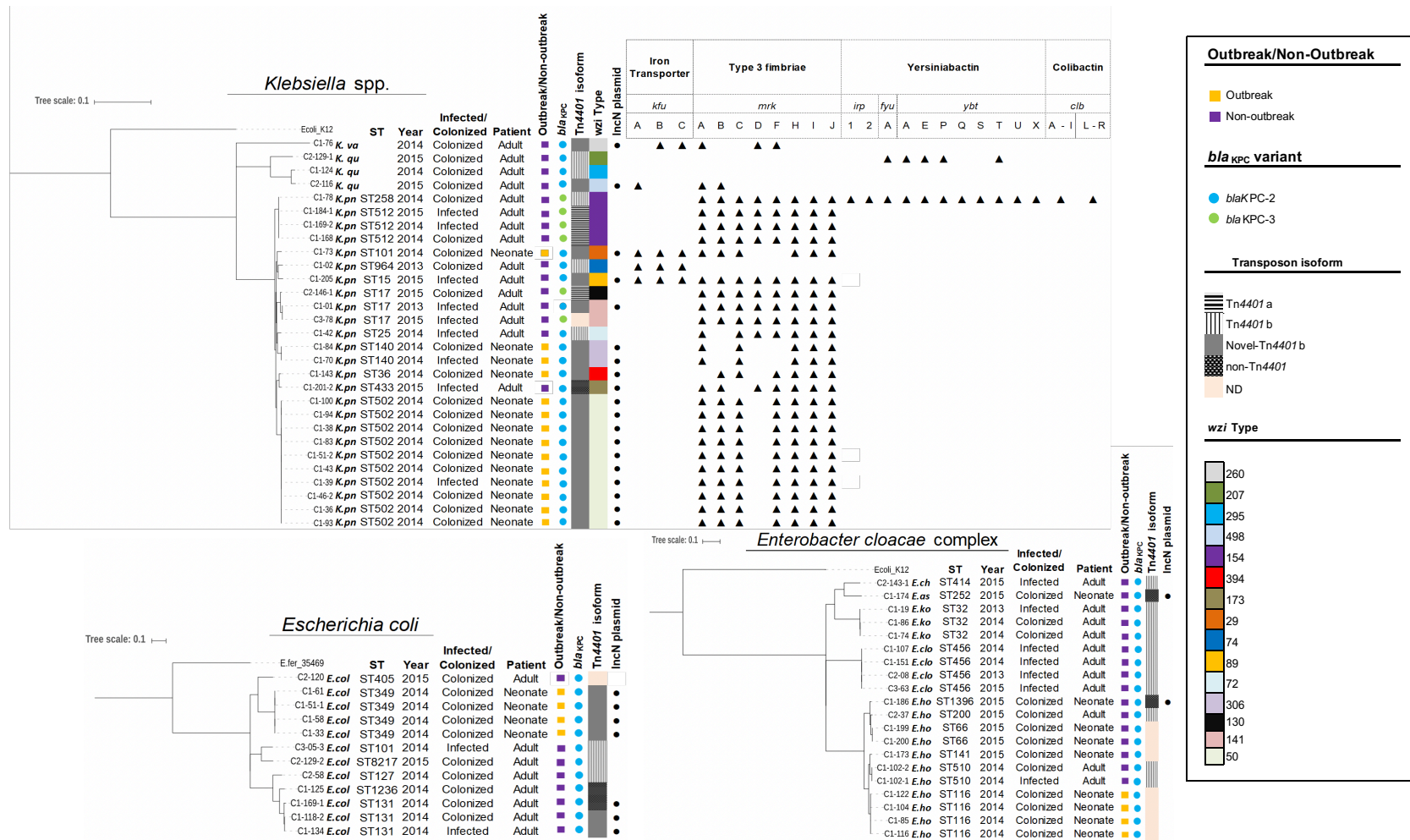


FIG 1 Phylogenetic tree showing the genetic relationships among isolates of *Klebsiella* spp. ($n = 29$), *E. coli* ($n = 12$), and *Enterobacter cloacae* complex ($n = 20$) harboring *bla*_{KPC}. The results were generated by RAxML and visualized by the iTOL program. For species assignment, "K.va" indicates *Klebsiella variicola*, "K.qu" indicates *Klebsiella quasipneumoniae*, "K.pn" indicates *Klebsiella pneumoniae*, "E.col" indicates *Escherichia coli*, "E.ch" indicates *Enterobacter chengduensis*, "E.as" indicates *Enterobacter asburiae*, "E.ko" indicates *Enterobacter kobei*, "E.clo" indicates *Enterobacter cloacae*, and "E.ho" indicates *Enterobacter hormaechei*. Isolates were characterized by ST and year of isolation. We show whether the isolate was recovered from an infected/colonized patient, a neonate or an adult patient, and from a outbreak/nonoutbreak. We indicate the *bla*_{KPC} variant, transposable element carrying *bla*_{KPC}, capsular type (*wzi* typing), IncN replicon plasmid identified in the different species of *Enterobacteriales* harboring *bla*_{KPC} and virulence determinants identified in *Klebsiella* spp.

4.3 Results

TABLE 1 Molecular characteristics of 72 KPC-producing *Enterobacteriales* isolates sequenced by Illumina platform

Species	ST ^a	Hospital	No. of isolates	Patient type	Variant of <i>bla</i> _{KPC-2}	Transposon isoform ^b	Additional resistance genes	Plasmid replicon type ^c	
<i>Klebsiella</i> spp. <i>K. pneumoniae</i>	ST502	1	10	Neonate	<i>bla</i> _{KPC-2}	Novel Tn4401b	<i>bla</i> _{SHV-62} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>fosA</i>	IncN , IncR	
	ST140	1	2	Neonate	<i>bla</i> _{KPC-2}	Novel Tn4401b	<i>bla</i> _{SHV-17} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>str(A,B)</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>fosA</i>	IncN , IncFIA, IncFII	
	ST101	1	1	Neonate	<i>bla</i> _{KPC-2}	Novel Tn4401b	<i>bla</i> _{SHV-17} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aph(3'')-lb</i> , <i>aph(6')-ld</i> , <i>str(A,B)</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>catA1</i> , <i>tet(D)</i> , <i>fosA</i>	IncN , IncFIB, IncFIB(K), IncFII, IncFII(K)	
	ST36	1	1	Neonate	<i>bla</i> _{KPC-2}	Novel Tn4401b	<i>bla</i> _{SHV-17} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>str(A,B)</i> , <i>oqx(A,B)</i>	IncN , IncR, IncFIB, IncFII	
	ST17	1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Novel Tn4401b	<i>bla</i> _{SHV-17} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>fosA</i>	IncN , IncFIB(K), IncFII	
			2	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-3}	Tn4401a	<i>bla</i> _{SHV-17} , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aadA2</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>cmlA1</i> , <i>tet(B,D)</i> , <i>fosA</i> , <i>dfrA15</i>	IncFIB(K), IncFIB(pQIL), IncFII, IncFII(K)
			3	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-3}	ND	<i>bla</i> _{SHV-17} , <i>sul1</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>catA1</i> , <i>tetD</i> , <i>fosA</i>	IncHI1B, IncFIB
	ST15	1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Novel Tn4401b	<i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aadA1</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>qnrB19</i> , <i>mph(A)</i> , <i>tet(A)</i> , <i>fosA</i>	IncN , ColpVC, IncFIB(K), IncFII(K), IncI1	
	ST433	1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Non-Tn4401	<i>bla</i> _{SHV-17} , <i>sul(1,2)</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aadA16</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>qnrB6</i> , <i>fosA5</i> , <i>arr3</i> , <i>dfrA27</i>	IncN , ColRNAI, IncFIB(K), IncFII(K), IncX3	
	ST964	1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{SHV-17} , <i>aac(3'')-IIa</i> , <i>aph(3'')-lb</i> , <i>aph(6')-ld</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>qnrB19</i> , <i>fosA</i>	IncFIA, IncFIB(K), IncFII(K)	
	ST25	1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{SHV-17} , <i>oqx(A,B)</i> , <i>fosA</i>	ND	
	ST258	1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-3}	Tn4401b	<i>bla</i> _{SHV-28f} , <i>sul(1,3)</i> , <i>aac(3)-IVa</i> , <i>aac(6')-lb</i> , <i>aph(4)-la</i> , <i>aad(A2,A24)</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>catA1</i> , <i>cmlA1</i> , <i>fosA</i> , <i>dfrA12</i>	ColRNAI, IncR, IncFIB(K), IncFII(K), IncI2	
			1	3	Adult	<i>bla</i> _{KPC-3}	Tn4401a	<i>bla</i> _{SHV-17} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb</i> , <i>aph(3)-la</i> , <i>aadA2</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>catA1</i> , <i>fosA</i> , <i>dfrA12</i>	ColRNAI, IncFIB(K), IncFIB(pQIL), IncFII(K), IncX3
	<i>K. variicola</i> <i>K. quasipneumoniae</i>		1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Novel Tn4401b	<i>bla</i> _{ENT-5f} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>oqx(A,B)</i>	IncN , IncFIB(K), IncFII(K)
			1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{OKP-A-5} , <i>sul1</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>fosA</i>	IncR, IncFII(K)
		2	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Novel Tn4401b	<i>bla</i> _{OKP-A-5} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>fosA</i>	IncN , IncR, IncFII(K)	
			2	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{OKP-B-3} , <i>sul2</i> , <i>rmtG</i> , <i>oqx(A,B)</i> , <i>qnrB19</i> , <i>fosA</i>	IncL/M(pMU407), IncHI1B, IncFIB, IncFII
<i>E. coli</i>	ST349	1	4	Neonate	<i>bla</i> _{KPC-2}	Novel Tn4401b	<i>bla</i> _{OXA-17} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aadA1</i> , <i>catA1</i> , <i>tet(B)</i>	IncN , IncFIB	
	ST131	1	2	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Novel Tn4401b	<i>bla</i> _{SHV-5f} , <i>sul1</i> , <i>sul3</i> , <i>aac(3)-IV</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aph(4)-la</i> , <i>aad(A1,A2)</i> , <i>cmlA1</i>	IncN , IncHI2, IncHI2A, IncFIB, IncFII, IncI1	
			1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Non-Tn4401	<i>sul(1,2)</i> , <i>aac(3)-IIId</i> , <i>aph(3'')-lb</i> , <i>aph(3)-IIId</i> , <i>aadA16</i> , <i>qnrB6</i> , <i>tet(A)</i> , <i>arr3</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA27</i>	IncN , IncFIA, IncFIB, IncFII
	ST1236	1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Non-Tn4401	<i>bla</i> _{TEM-1A}	ColRNAI, IncY	
	ST405	2	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	ND	<i>bla</i> _{CMY-2} , <i>sul(1,2)</i> , <i>aac(3)-IIId</i> , <i>aadA5</i> , <i>aph(3'')-lb</i> , <i>aph(6')-ld</i> , <i>str(A,B)</i> , <i>mph(A)</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA17</i>	IncFIB, IncFII, IncI1	
	ST8217	2	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401 b	<i>bla</i> _{CTX-M12} , <i>sul(1,2)</i> , <i>aadA1</i> , <i>rmtG</i> , <i>qnrB19</i> , <i>mdf(A)</i>	IncL/M(pMU407), IncHI1B, IncFIB, IncFII, IncI1	
	ST127	2	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>aac(3'')-IIa</i> , <i>str(A,B)</i> , <i>qnrB19</i>	IncN2, IncFII	
	ST101	3	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>sul(2,3)</i> , <i>aad(A1,A2)</i> , <i>str(A,B)</i> , <i>qnrB19</i> , <i>cmlA1</i> , <i>floR</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(M)</i> , <i>dfrA12</i>	IncL/M(pMU407), IncN2, IncFIB, IncX1	
	<i>Enterobacter cloacae</i> complex <i>E. hormaechei</i>	ST1396*	1	1	Neonate	<i>bla</i> _{KPC-2}	Non-Tn4401	<i>bla</i> _{ACT-7} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aph(3'')-lb</i> , <i>aadA16</i> , <i>qnrB6</i> , <i>fosA</i> , <i>arr-3</i> , <i>dfrA27</i>	IncN , IncFIB(K)
		ST116	1	4	Neonate	<i>bla</i> _{KPC-2}	ND	<i>bla</i> _{ACT-7} , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')-lb</i> , <i>aph(6)-ld</i> , <i>str(A,B)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>fos(A)</i> , <i>dfrA14</i>	IncFIB, IncFII
ST66		1	2	Neonate	<i>bla</i> _{KPC-2}	ND	<i>bla</i> _{ACT-7} , <i>bla</i> _{ACT-16f} , <i>fosA</i> , <i>aph(6')-ld</i>	IncFIB, IncFII	
ST141		1	1	Neonate	<i>bla</i> _{KPC-2}	ND	<i>bla</i> _{ACT-7}	IncFIB(K), IncFII	
ST510		1	2	Neonate	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{ACT-7} , <i>sul(1,2)</i> , <i>aac(3)-IIId</i> , <i>aadA2</i> , <i>mph(A)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>fosA</i> , <i>dfrA12</i>	IncFII, IncL/M, IncX5	
ST200		2	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{ACT-16f} , <i>bla</i> _{CTX-M12} , <i>sul(1,2)</i> , <i>aac(3)-IIId</i> , <i>aac(6')-lan</i> , <i>aph(3'')-lb</i> , <i>aph(6')-ld</i> , <i>aadA2</i> , <i>qnrE1</i> , <i>mph(A)</i> , <i>catA2</i> , <i>tet(D)</i> , <i>fosA</i> , <i>dfrA12</i> , <i>mcr-9</i>	IncN2, IncHI2, IncHI2A, IncFIB, IncFII, IncX5	

(Continued on next page)

4.3 Results

TABLE 1 (Continued)

Species	ST ^a	Hospital	No. of isolates	Patient type	Variant of <i>bla</i> _{KPC-2}	Transposon isoform ^b	Additional resistance genes	Plasmid replicon type ^c
<i>E. asburiae</i>	ST252	1	1	Neonate	<i>bla</i> _{KPC-2}	Non-Tn4401	<i>bla</i> _{ACT-3} , <i>bla</i> _{ACT-7} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aadA16</i> , <i>qnrE1</i> , <i>qnrB6</i> , <i>fosA</i> , <i>arr3</i> , <i>dfrA27</i>	IncN , IncFIB(K)
<i>E. cloacae</i>	ST456	1	2	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{CMH-3} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aac(6')-lb3</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>mphA</i> , <i>fosA</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA12</i>	ND
		2	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{CMH-3} , <i>bla</i> _{CTX-M-12} , <i>sul(1,2)</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aac(3)-IId</i> , <i>aac(6')-lb3</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>rmtG</i> , <i>qnrB19</i> , <i>mph(A)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>fosA</i> , <i>dfrA(1,12)</i>	IncL/M
	3	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{CHM-3} , <i>bla</i> _{CTX-M-12} , <i>sul1</i> , <i>aac(3)-IId</i> , <i>aac(6')-lb3</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>aad(A1,A2)</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>mph(A)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>fosA</i> , <i>dfrA(1,A12)</i>	ND	
<i>E. kobei</i>	ST32	1	2	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{ACT-9} , <i>aph(3')-lb</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aacA4</i> , <i>fosA</i>	IncN2
		1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{ACT-9} , <i>sul1</i> , <i>aac(3')-IIa</i> , <i>aac(3)-VIa</i> , <i>aph(3')-lb</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aadA1</i> , <i>qnrB19</i> , <i>tet(A)</i> , <i>fosA</i> , <i>mcr-9</i>	IncN2
<i>E. chengduensis</i>	ST414	2	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{ACT-6} , <i>aac(3')-IIa</i> , <i>aph(3')-lb</i> , <i>aph(6')-Id</i> , <i>qnrB19</i> , <i>fosA</i>	IncN2
<i>Citrobacter</i> spp. <i>C. portucalensis</i>		1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{CMY-77} , <i>sul(1,2)</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aad(A2,A16)</i> , <i>qnrB19</i> , <i>qnrB6</i> , <i>mph(A)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>arr-3</i> , <i>dfrA12</i> , <i>dfrA27</i>	IncN , IncHI1A(CIT), IncHL1B(CIT), IncX5
<i>C. freundii</i>	ST215	1	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{CMY-110} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>aadA16</i> , <i>qnrB6</i> , <i>arr-3</i> , <i>dfrA27</i>	IncN , RepA
	ST169	2	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{CMY-65} , <i>qnrB38</i>	Col4401, IncFIB(pHCM2), IncX5
	ST504*	2	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{CMY-65} , <i>bla</i> _{CTX-M15} , <i>sul1</i> , <i>aac(3')-IIa</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aph(3')-lb</i> , <i>aph(6')-Id</i> , <i>aadA1</i> , <i>qnrB60</i> , <i>qnrB38</i> , <i>mph(A)</i> , <i>erm(B)</i> , <i>catB3</i> , <i>cmlA1</i>	IncN2, IncFII(K), RepA
	ST22	2	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{CMY-48} , <i>sul(1,2)</i> , <i>aac(3')-IIa</i> , <i>aac(6')-IAn</i> , <i>aph(3')-lb</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(6')-Id</i> , <i>aad(A10,A1)</i> , <i>qnrB19</i> , <i>tet(B)</i> , <i>tet(D)</i> , <i>dfrA1</i>	IncN2, RepA
<i>Serratia marcescens</i>		1	4	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401 b	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-12} , <i>sul(1,2)</i> , <i>aac(3')-IIa</i> , <i>aac(6')-Ic</i> , <i>qnrB19</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>tet(41)</i>	IncA/C, IncA/C2, IncN2, IncR, IncHI1A(CIT), IncHL1B(CIT), IncP6
		3	1	Neonate	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>sul(1,2)</i> , <i>aac(3')-IIa</i> , <i>aac(6')-Ic</i> , <i>aac(6')-IAn</i> , <i>aph(3')-lb</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(6')-Id</i> , <i>aadA10</i> , <i>catA1</i> , <i>dfrA1</i>	IncA/C2, IncN2
		3	1	Adult	<i>bla</i> _{KPC-2}	Tn4401b	<i>bla</i> _{SRT-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-12} , <i>sul1</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>aac(6')-Ic</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aadA5</i>	IncL/M

^a*, new sequence type (ST).

^bND, not detected.

^cThe IncN plasmid replicon type is indicated in boldface.

4.3.5 Characterization of IncN plasmids involved in dissemination of *bla*_{KPC-2}

We evaluated the transferability of *bla*_{KPC-2} by mating assays, selecting one *K. pneumoniae* ST15 (C1-205) isolate carrying the *bla*_{KPC-2} on the novel Tn4401b and IncN plasmid replicon type as donor. We readily transferred *bla*_{KPC-2} into *E. coli* J53 with a conjugation efficiency of 1×10^{-2} per donor cells. We selected the transconjugant (*E. coli* Tc_C1- 205) and other *Enterobacteriales*

4.3 Results

(C1-70, C1-83, C1-93, C1-94, C1-143, C1-134, C1-205, and C2-116) to characterize the genetic location of *bla*_{KPC-2}. Our results indicated that all isolates had *bla*_{KPC2} located on an ~56-Kb plasmid (see Fig. S5).

To reconstruct the complete plasmid sequence, we selected one *K. pneumoniae* ST502 isolate (C1-94) and sequenced the genome using the MinION platform (long-read sequencing). The 56,321-bp plasmid was designated pIncN_C1-94_KPC and determined to be ST15 at the pMLST (Fig. 2a). We confirmed that the plasmid carried the novel Tn440Ib associated with a class 1 integron and other resistance genes [*sull*, *qacEDelta1*, *aac(6=)Ib-cr*]. Subsequently, we used this plasmid sequence to determine its presence in each isolate using the Illumina data (short read). We identified the plasmid in the transconjugant strain (*E. coli* Tc_C1-205) and 24 *Enterobacterales* isolates (Fig. 2a). Our findings support the notion that pIncN_C1-94-KPC mediated the initial neonatal outbreak, spreading to other units within the same hospital, and was circulating simultaneously in other regional hospitals into different *Enterobacterales*.

We also detected a second IncN plasmid in some isolates that carried the *bla*_{KPC-2} on non-Tn440I elements (NTE_{KPC}) (C1-169-1, C1-201-2, C1-186, and C1-174). This plasmid was similar to a completely sequenced pEC881_KPC plasmid (accession number CP019026.1) from an *E. coli* strain recovered in Cali, Colombia, in 2013 (31) (Fig. 2b). Likewise, we identified the backbone of this plasmid in *Citrobacter portucalensis* (C1-154) and *C. freundii* ST215 (C1-185) isolates recovered from adults at hospital 1 (Fig. 2b).

4.3 Results

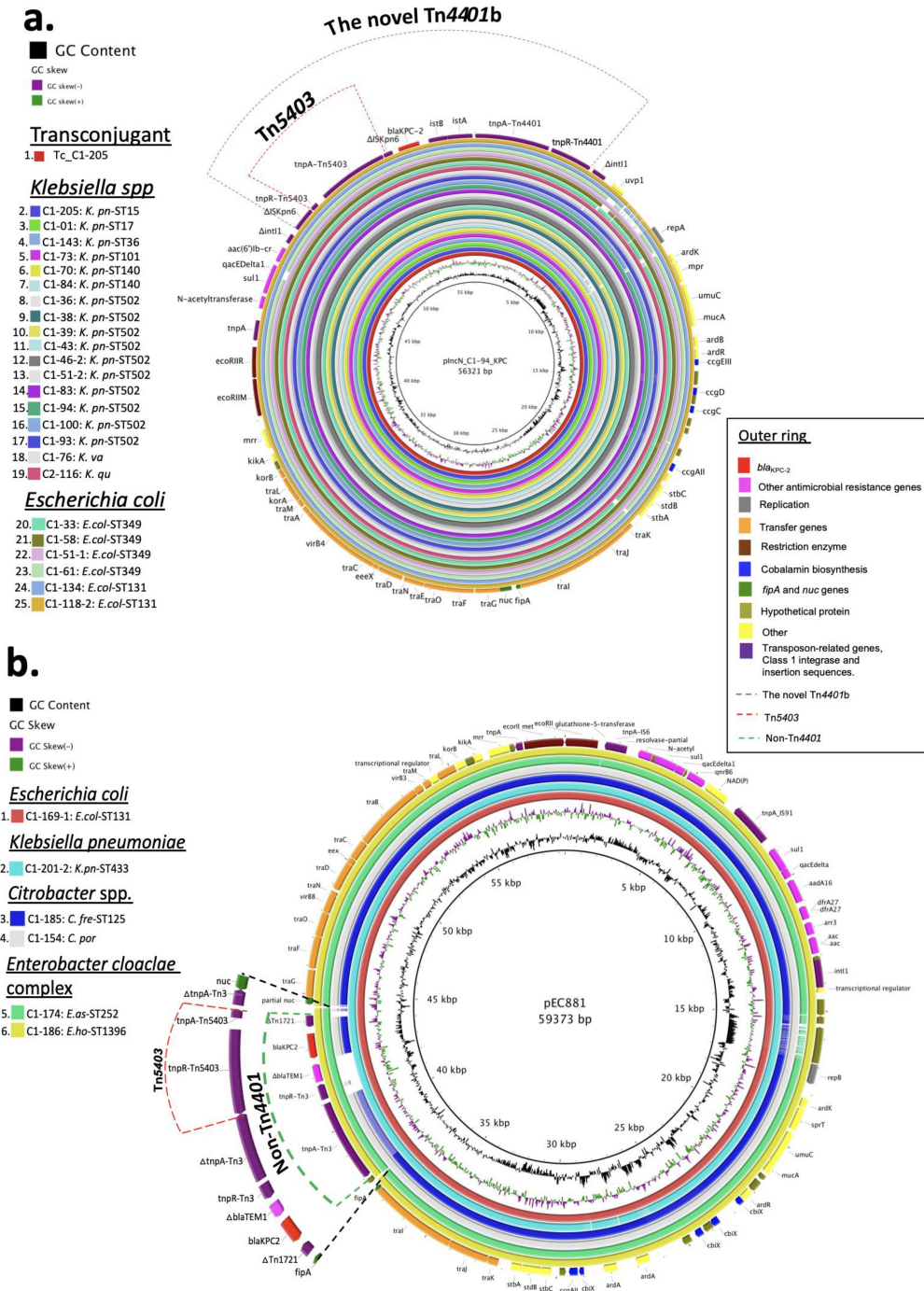


FIG 2 (a) BLAST Ring Image Generator (BRIG 0.95 and BLASTN v2.2.29) alignment of 24 sequenced *bla*_{KPC-2}-carrying *Enterobacteriales* and the Tc_C1-205 transconjugant harboring the annotated *plncN_C1-94_KPC* (accession number "contig_241_1" within WGS genome SAMN07291374; inside ring). Each isolate and the Tc_C1-205 transconjugant are indicated by a ring of different color (left panel). The outer ring shows resistance genes, as well as the structural genes of *plncN_C1-94_KPC* indicated by different colors (right panel). The novel transposon Tn4401 (blue dotted line) harboring an insertion of Tn5403 (red dotted line) into *ISkpn6* is also shown. (b) BLAST Ring Image Generator (BRIG 0.95 and BLASTN v2.2.29) of six sequenced *bla*_{KPC-2}-carrying *Enterobacteriales* isolates using plasmid pEC881 as reference (accession number CP019026.1) from an *E. coli* recovered in Cali, Colombia, 2013 (inside ring). Each isolate is indicated by a ring of different color (left panel). The outer ring shows the resistance and structural genes indicated by different colors (right panel). The NTE_{KPC} element (green dotted line) harboring an insertion of Tn5403 (red dotted line) into *tnpA*(Tn3) in C1-174 and C1-186 isolates is also shown.

4.4 DISCUSSION

In this study, we characterized the dynamics of dissemination of *bla*_{KPC-2} in different genera and species of *Enterobacterales* in hospitals serving an area of endemicity in Colombia with more than 2 million inhabitants. We show that broad dissemination of *bla*_{KPC} is facilitated by intra- and interspecies HGT mediated by promiscuous plasmids associated with transposable elements. This mechanism of spread led initially to a multispecies outbreak of KPC-2-producing *Enterobacterales* in a neonatal care unit. Subsequently, the *bla*_{KPC-2}-carrying plasmids were detected in *Enterobacterales* recovered from adult units in the same hospital and nearby hospitals over 3 years. The gene “epidemic” was driven by IncN-pST15-type plasmids carrying a novel Tn4401b structure and non-Tn4401 elements (NTE_{KPC}).

Previous studies (18, 19) had suggested that dissemination of *bla*_{KPC-2} among *K. pneumoniae* non-CG258 in Colombia was mainly due to HGT, as well as its dissemination in other *Enterobacterales* (36, 37). Our study, using an extended and comprehensive evaluation of *Enterobacterales* recovered from colonized and infected patients in a high-endemicity area of Colombia, supports that concept and shows the efficient and expanding spread of carbapenem resistance, occurring mainly from hospitalized patients with the possibility of “spillover” to the community maintaining high circulation of these genes. Consistent with previous observations, *K. pneumoniae* isolates belonging to CG258 and carrying *bla*_{KPC-3} also circulated simultaneously with other genetic backgrounds (mostly harboring *bla*_{KPC-2}). This phenomenon has created a “perfect storm” for dissemination of carbapenem resistance in Colombia (19).

4.4 Discussion

Interestingly, multiple species of KPC-2-producing *Enterobacterales* ($n = 24$) were recovered in the NICU outbreak and adult units from hospital 1 and, subsequently, in nearby hospitals. The isolates exhibited heterogeneous genetic backgrounds but had in common the location of bla_{KPC-2} gene within a novel Tn440Ib element which harbors an insertion of Tn5403 transposon into the ISKpn6 (Fig. 1 and see Fig. S1). The Tn5403 element was previously identified as a “helper” element that participated in the transfer of nonconjugative plasmids, found in isolates of *K. pneumoniae* recovered from polluted aquatic environments (38). It was also found in isolates of *Raoultella ornithinolytica*, a microorganism widely distributed in aquatic environments, insects, and fish (39). Of note, Tn5403 only contains genes related to transpositions function and is known to transpose by replicative transposition. The element seems to play as “disruptive” or “reorganizing” force via transposition within plasmids from clinical isolates (40). Thus, it is tempting to speculate that this novel Tn440Ib structure could have originated through the introduction of Tn5403 element mediated by homologous recombination between environmental and human-adapted hospital isolates.

Our analysis of short- and long-read whole-genome sequencing revealed that the novel Tn440Ib element was harbored within the pIncN_C1-94_KPC plasmid, which was identified in the 24 *Enterobacterales* isolates described above (Fig. 2a), showing a high conjugation efficiency, as has been previously described in IncN-type plasmids (41–43). An additional non-Tn440I element “carrier” of bla_{KPC-2} (NTE_{KPC}) was also identified in different species of *Enterobacterales* from neonates and adults (Table 1), harbored in a plasmid similar to the IncN pEC881_KPC reported previously (31) (Fig. 2b). Thus, these two IncN plasmids played a key role in the transmission

4.4 Discussion

interspecies of *bla*_{KPC-2} in some of the participating hospitals. Presumably, transposition of Tn5403 occurred and facilitated plasmid rearrangements (40).

Our findings are in agreement with previous studies (15, 28, 43–47) by showing that the interspecies spread of *bla*_{KPC-2} through plasmids adds an additional layer of complexity to the molecular investigation of multispecies outbreaks and strongly suggest conjugation capacity and high plasticity of IncN ST15 plasmids in the gastrointestinal environment within a patient. Thus, the data in the study indicated that dissemination of the *bla*_{KPC-2} gene started in July 2013 in a *K. pneumoniae* ST17 isolate from an infected adult patient localized in non-ICU in hospital 1 that carried the *bla*_{KPC2} within the novel Tn4401b into pIncN_C1-94_KPC plasmid. This plasmid seems to be the source of the subsequent outbreaks in the neonatal unit.

Figure 3 attempts to reconstruct the events of dissemination of *bla*_{KPC2} of the outbreak. Our data suggest that, in the beginning of the outbreak (March 2014), the clonal dissemination of *bla*_{KPC2} by non-CG258 lineage of *K. pneumoniae* ST502 occurred, followed by emergence of KPC-2-producing *E. coli* ST349 by acquisition of the pIncN_C1-94_KPC plasmid (Fig. 2a) and subsequent spread to other species of *Enterobacteriales* (March to December 2014). In parallel, an *E. coli* ST131 recovered from an adult patient in non-ICU setting carried the *bla*_{KPC-2} on NTE_{KPC} within a plasmid highly similar to pECC881_KPC (Fig. 2b). After the outbreak was controlled (2015), we detected sporadic cases in neonates colonized by *E. asburiae* ST252 (C1-174) and *E. hormaechei* ST1396 (C1-186) carrying *bla*_{KPC-2} in the same plasmid pEC881_KPC, with some variations in the region containing the *bla*_{KPC2}. Also, in the adult unit *C. freundii* ST215 (C1-185) and *C. portucalensis* (C1-154) were identified carrying the backbone of pEC881_KPC, albeit

4.4 Discussion

carrying a *Tn440Ib* (Fig. 2b), suggesting gene rearrangement likely through transposition and homologous recombination. Likewise, one isolate of *K. quasipneumoniae* (C2-116) recovered from an adult patient in hospital 2 (January 2015), harbored the pIncN_C1-94_KPC plasmid.

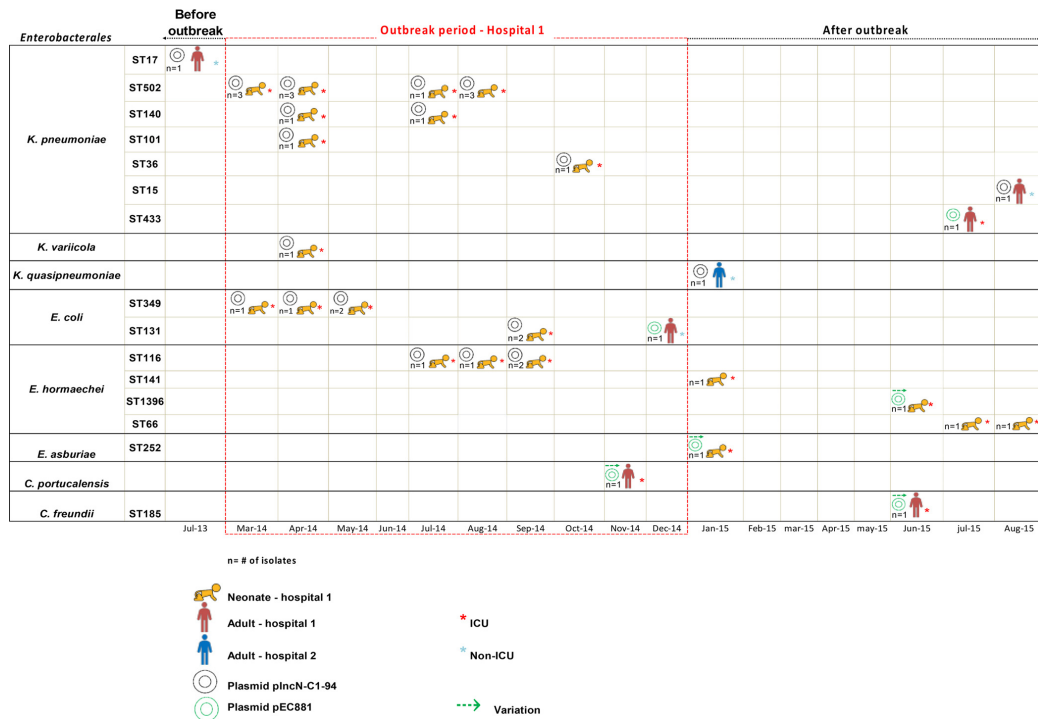


FIG 3 Timeline of the outbreak and dissemination of *bla*_{KPC2} among different *Enterobacteriales* in hospitals located in Medellin and surrounding areas (2013 to 2015). The neonates are in orange, adult from hospital 1 in brown and adult from hospital 2 in dark blue. The asterisk indicates the place of stay in ICU (red) and non-ICU (light blue) at the time of sampling. The type of plasmid identified in the isolates are indicated with black and green ring. Those that exhibited variations within mobile elements are indicated with a green arrow pointing to the right.

Another important finding in our study is the identification of a group of closely related *E. cloacae* ST456 isolates ($n = 4$) carrying *bla*_{KPC-2} on *Tn440Ib* (Fig. 1), a finding only previously reported in Norway (48). Of note, *E. kobei* ST32 and *E. hormaechei* ST200 isolates recovered from infected and colonized adult patients carried the *mcr-9* gene within a genetic environment similar to a previous isolate described in USA (Fig. S2). The *mcr-9* was described initially in *Salmonella enterica* and *E. coli* (34, 49), and later in *Enterobacter* spp. and *Klebsiella pneumoniae* and has been associated with carbapenemase-encoding genes (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-4}, and *bla*_{OXA-48}) in the United States, China, and European countries (35, 50, 51). In South America, it has recently

4.5 Conclusions

been described in *K. quasipneumoniae* associated with $bla_{\text{NDM-1}}$ in Argentina (52). To our knowledge, this is the first report of *Enterobacter* spp. harboring *mcr-9* and $bla_{\text{KPC-2}}$. However, at the time of isolation, the organisms were susceptible to colistin therefore it is likely that the *mcr-9* gene was not expressed, a finding consistent with previous reports (53). Of note, *mcr-9* had not been previously reported in Colombia.

Some limitations of the study include the limited number of hospitals in the region and that we were not able to resolve all plasmid sequences by long-read sequencing. Seven isolates of *E. hormaechei* involved in the NICU outbreak could have lost the bla_{KPC} gene or the plasmid that contained it during storage or subculture processing prior to sequencing. Therefore, it was not possible to define the genetic environment of bla_{KPC} gene in those isolates. However, we used the analysis of those genomes in the study to describe aspects related to the outbreak in NICU from hospital 1.

4.5 CONCLUSIONS

In conclusion, the KPC carbapenemase epidemic in an area of high endemicity in Colombia is driven by the horizontal transfer of promiscuous plasmids harboring $bla_{\text{KPC-2}}$ among members of the *Enterobacterales*. This phenomenon has resulted in the occurrence of multispecies outbreak and high-level of genetic diversity of KPC-producing *Enterobacterales*. Our findings provided evidence of an epidemic of plasmid carrying bla_{KPC} rather than clonal expansion of successful genetic lineage. Interrupting plasmid transmission is a challenge for public health interventions in developing countries.

4.6 REFERENCES

1. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem- resistant *Enterobacteriaceae*: the impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis.* 2017;215:S28 –S36. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>.
2. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3:15–21. <https://doi.org/10.1177/2049936115621709>.
3. Patel G, Bonomo RA. “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol.* 2013;4:48. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00048>.
4. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:821–830. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>.
5. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem- hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1151–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>.
6. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, Carmeli Y, Israeli KPC Kpn Study Group. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing

4.6 References

- Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:818 – 820. <https://doi.org/10.1128/AAC.00987-08>.
7. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53: 3365–3370. <https://doi.org/10.1128/AAC.00126-09>.
 8. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009;9:228–236. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4).
 9. Woodford N, Tierno PM, Jr, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livermore DM. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:4793–4799. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.12.4793-4799.2004>.
 10. Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E, Kristo I, Dimitroulia E, Vitti D, Tsalidou M, Maniatis AN, Tsakris A, Sofianou D. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64:348–352. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp207>.

4.6 References

11. Mammìna C, Palma DM, Bonura C, Anna Plano MR, Monastero R, Sodano C, Calà C, Tetamo R. Outbreak of infection with *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 3 in an intensive care unit in Italy. *J Clin Microbiol.* 2010;48:1506–1507. <https://doi.org/10.1128/JCM.00315-10>.
12. Ocampo AM, Vargas CA, Sierra P, Cienfuegos AV, Jiménez JN. Molecular characterization of an outbreak of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in a high complexity hospital in Medellín, Colombia. *Biomedica.* 2015;35:496–504. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v35i4.2610>.
13. Lopez JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Briceño DF, Montealegre MC, Quinn JP, Carmeli Y, Villegas MV. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:52–56. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03209.x>.
14. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28:565–591. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>.
15. Schweizer C, Bischoff P, Bender J, Kola A, Gastmeier P, Hummel M, Klefisch FR, Schoenrath F, Frühauf A, Pfeifer Y. Plasmid-mediated transmission of KPC-2 carbapenemase in

4.6 References

- Enterobacteriaceae* in critically ill patients. *Front Microbiol.* 2019;10:276. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00276>.
16. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP, Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50:2880–2882. <https://doi.org/10.1128/AAC.00186-06>.
17. Rada AM, Hernández-Gómez C, Restrepo E, Villegas MV. Distribution and molecular characterization of beta-lactamases in Gram-negative bacteria in Colombia, 2001–2016. *Biomedica.* 2019;39:199–220. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>.
18. Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos AV, Roncancio G, Chavda KD, Kreiswirth BN, Jiménez JN. A two-year surveillance in five Colombian tertiary care hospitals reveals high frequency of non-CG258 clones of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with distinct clinical characteristics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:332–342. <https://doi.org/10.1128/AAC.01775-15>.
19. Rojas LJ, Weinstock GM, De La Cadena E, Diaz L, Rios R, Hanson BM, Brown JS, Vats P, Phillips DS, Nguyen H, Hujer KM, Correa A, Adams MD, Perez F, Sodergren E, Narechania A, Planet PJ, Villegas MV, Bonomo RA, Arias CA. An analysis of the epidemic of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: convergence of two evolutionary

4.6 References

- mechanisms creates the “perfect storm.” *J Infect Dis.* 2018;217:82–92. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix524>.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27th informational supplement– M100-S27. CLSI. Wayne, PA. 2017.
21. Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST ring image generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics.* 2011;12:402. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402>.
22. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1355–1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>.
23. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:2640–2644. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.
24. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>.

4.6 References

25. Naas T, Cuzon G, Truong HV, Nordmann P. Role of ISKpn7 and deletions in *bla*_{KPC} gene expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:4753–4759. <https://doi.org/10.1128/AAC.00334-12>.
26. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014;30:1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
27. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>.
28. Hardiman CA, Weingarten RA, Conlan S, Khil P, Dekker JP, Mathers AJ, Sheppard AE, Segre JA, Frank KM. Horizontal transfer of carbapenemase-encoding plasmids and comparison with hospital epidemiology data. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:4910 – 4919. <https://doi.org/10.1128/AAC.00014-16>.
29. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* 1995;226:235–240. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1220>.
30. Liu SL, Hessel A, Sanderson KE. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and

4.6 References

- other bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90:6874 – 6878. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6874>.
31. Stoesser N, Sheppard AE, Peirano G, Anson LW, Pankhurst L, Sebra R, Phan HTT, Kasarskis A, Mathers AJ, Peto TEA, Bradford P, Motyl MR, Walker AS, Crook DW, Pitout JD. Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) producing *Escherichia coli*. Sci Rep. 2017;7:5917. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06256-2>.
32. Chen L, Chavda KD, Al Laham N, Melano RG, Jacobs MR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Complete nucleotide sequence of a *bla*_{KPC}-harboring IncI2 plasmid and its dissemination in New Jersey and New York hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57:5019 –5025. <https://doi.org/10.1128/AAC.01397-13>.
33. Wu W, Feng Y, Zong Z. Characterization of a strain representing a new *Enterobacter* species, *Enterobacter chengduensis* sp. nov. Antonie Van Leeuwenhoek. 2019;112:491–500. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1180-z>.
34. Carroll LM, Gaballa A, Guldimann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of novel mobilized colistin resistance gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. mBio. 2019;10:e00853-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19>.

4.6 References

35. Yuan Y, Li Y, Wang G, Li C, Xiang L, She J, Yang Y, Zhong F, Zhang L. Coproduction of MCR-9 and NDM-1 by colistin-resistant *Enterobacter hormaechei* isolated from bloodstream infection. *Infect Drug Resist.* 2019;12: 2979–2985. <https://doi.org/10.2147/IDR.S217168>.
36. Cuzon G, Naas T, Correa A, Quinn JP, Villegas MV, Nordmann P. Dissemination of the KPC-2 carbapenemase in non-*Klebsiella pneumoniae* enterobacterial isolates from Colombia. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42:59–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.04.002>.
37. Mojica MF, Correa A, Vargas DA, Maya JJ, Montealegre MC, Rojas LJ, Ruiz SJ, Quinn JP, Villegas MV, Colombian Nosocomial Bacterial Resistance Study Group. Molecular correlates of the spread of KPC-producing *Enterobacteriaceae* in Colombia. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;40:277–279. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.05.006>.
38. Rinkel M, Hubert J, Roux B, Lett M. Identification of a new transposon Tn5403 in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a polluted aquatic environment. *Curr Microbiol.* 1994;29:249–254. <https://doi.org/10.1007/BF01577436>
39. Sun F, Yin Z, Feng J, Qiu Y, Zhang D, Luo W, Yang H, Yang W, Wang J, Chen W, Xia P, Zhou D. Production of plasmid-encoding NDM-1 in clinical *Raoultella ornithinolytica* and *Leclercia adecarboxylata* from China. *Front Microbiol.* 2015;6:458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00458>.

4.6 References

40. He S, Chandler M, Varani AM, Hickman AB, Dekker JP, Dyda F. Mechanisms of evolution in high-consequence drug resistance plasmids. *mBio*. 2016; 7:e01987-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01987-16>.
41. Jørgensen NH, Stenderup A. An IncN plasmid exhibiting a high frequency of transfer in broth media. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand B*. 1982;90:323–324. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1982.tb00125.x>.
42. Li J-J, Lee C-S, Sheng J-F, Doi Y. Complete sequence of a conjugative IncN plasmid harboring *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SHV-12}, and *qnrS1* from an *Escherichia coli* sequence type 648 strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58:6974–6977. <https://doi.org/10.1128/AAC.03632-14>.
43. Adler A, Khabra E, Paikin S, Carmeli Y. Dissemination of the *bla*_{KPC} gene by clonal spread and horizontal gene transfer: comparative study of incidence and molecular mechanisms. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71: 2143–2146. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw106>.
44. Mathers AJ, Cox HL, Kitchel B, Bonatti H, Brassinga AK, Carroll J, Scheld WM, Hazen KC, Sifri CD. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *mBio*. 2011;2: e00204-11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00204-11>.
45. Kukla R, Chudejova K, Papagiannitsis CC, Medvecky M, Habalova K, Hobzova L, Bolehovska R, Pliskova L, Hrabak J, Zemlickova H. Characterization of KPC-encoding

4.6 References

- plasmids from *Enterobacteriaceae* isolated in a Czech hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62:e02152-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.02152-17>.
46. Stoesser N, Phan HTT, Seale AC, Aiken Z, Thomas S, Smith M, Wyllie D, George R, Sebra R, Mathers AJ, Vaughan A, Peto TEA, Ellington MJ, Hopkins KL, Crook DW, Orlek A, Welfare W, Cawthorne J, Lenney C, Dodgson A, Woodford N, Walker AS, TRACE Investigators' Group. Genomic epidemiology of complex, multispecies, plasmid-borne *bla*_{KPC} carbapenemase in *Enterobacterales* in the United Kingdom from 2009 to 2014. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;21:e02244-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02244-19>
47. Chmelnitsky I, Shklyar M, Leavitt A, Sadovsky E, Navon-Venezia S, Ben Dalak M, Edgar R, Carmeli Y. Mix and match of KPC-2 encoding plasmids in *Enterobacteriaceae*-comparative genomics. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;79:255–260. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.008>.
48. Samuelson Ø, Overballe-Petersen S, Bjørnholt JV, Brisse S, Doumith M, Woodford N, Hopkins KL, Aasnæs B, Haldorsen B, Sundsfjord A, Norwegian Study Group on CPE. Molecular and epidemiological characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Norway, 2007 to 2014. *PLoS One.* 2017;12:e0187832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187832>.
49. Kieffer N, Royer G, Decousser JW, Bourrel AS, Palmieri M, Ortiz De La Rosa JM, Jacquier H, Denamur E, Nordmann P, Poirel L. *mcr-9*, an inducible gene encoding an acquired

4.6 References

- phosphoethanolamine transferase in *Escherichia coli*, and its origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63: e00965-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00965-19>.
50. Chavda KD, Westblade LF, Satlin MJ, Hemmert AC, Castanheira M, Jenkins SG, Chen L, Kreiswirth BN. First report of *bla*_{VIM-4}- and *mcr-9*- coharboring *Enterobacter* species isolated from a pediatric patient. *mSphere.* 2019;4:e00629-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00629-19>.
51. Wang Y, Liu F, Hu Y, Zhang G, Zhu B, Gao GF. Detection of mobile colistin resistance gene *mcr-9* in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains of human origin in Europe. *J Infect.* 2020;80:578–606. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.12.016>.
52. Faccone D, Martino F, Albornoz E, Gomez S, Corso A, Petroni A. Plasmid carrying *mcr-9* from an extensively drug-resistant NDM-1- producing *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* clinical isolate. *Infect Genet Evol.* 2020; 81:104273. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104273>.
53. Tyson GH, Li C, Hsu CH, Ayers S, Borenstein S, Mukherjee S, Tran TT, McDermott PF, Zhao S. The *mcr-9* gene of *Salmonella* and *Escherichia coli* is not associated with colistin resistance in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020; 64:e00573-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00573-20>.

5

Escherichia coli ST471 PRODUCING VIM-4
METALLO- β -LACTAMASE IN COLOMBIA:
A BRIEF REPORT

Rada AM, Correa A, Restrepo E, Capataz C. Escherichia coli ST471 Producing VIM-4 Metallo- β -lactamase in Colombia. Microbial Drug Resistance (Submitted)

Abstract

An *Escherichia coli* isolate sequence type 471 (ST471) producing VIM-4 metallo- β -lactamase was recovered from a rectal swab in a patient without travel records with osteomyelitis in Colombia. The isolate carried the *bla*_{VIM-4} with a 170-bp duplicated region in the last position associated with a class 1 integron-integrase (*intI1*). The regions containing *bla*_{VIM-4}, *bla*_{CMY-2} and *sul2* genes showed similarities to the backbone of pKKp4, an IncA/C type plasmid from a *K. pneumoniae* strain carrying *bla*_{VIM-4} recovered in Kuwait. This is the first report of *bla*_{VIM-4} in *Enterobacterales* in South America. Our results suggest that *bla*_{VIM-4} gene was on an IncA/C type plasmid that could play a role in the spread of VIM-4 carbapenemase in Colombia.

Key words: *Escherichia coli*, metallo- β -lactamase, *bla*_{VIM-4}, colonization

5.1 BRIEF REPORT

The metallo- β -lactamases (MBLs) enzymes catalyze the hydrolysis of virtually all β -lactam drugs, with the exception of monobactams (e.g. aztreonam). The MBLs are not inhibited by the clinically available β -lactamase inhibitors such as sulbactam, clavulanic acid, tazobactam and avibactam, but are inhibited by chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid EDTA (1). These enzymes have been of clinical interest due to their broad spectra of *in vitro* resistance. They are plasmid-encoded, facilitating their rapid dissemination by horizontal transfer among Gram-negative bacteria, and their appearance together with other resistance mechanisms has narrowed down treatment options for infections caused by these bacteria (2,3).

MBLs belong to the Ambler molecular classification class B, and are divided into three subclasses B1, B2, and B3, of which the B1 subclass enzymes have emerged as the most clinically relevant. Currently, the Verona Integron-encoded MBLs (VIM) constitute one of the largest groups of this subclass (1). VIM-1 was the first variant described in Italy (Verona) in 1997 (4), followed by VIM-2 in France, in a carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate (5), which is the most commonly MBL reported worldwide (6). However, other variants, such as VIM-4, have been frequently reported in strains of the *Enterobacteriales* in European, African and Asian countries (7-10). In Latin America VIM-2 is the allelic variant most commonly reported in Chile, Venezuela, Brazil, Peru, Uruguay and Argentina in *P. aeruginosa* isolates (11). In Colombia, the first evidence of VIM was in 2004, identified in an outbreak of multidrug-resistant *P. aeruginosa* harboring VIM-8 (12). Later the VIM-2 was detected in *P. aeruginosa*, and VIM-24 in *Klebsiella pneumoniae* in several cities in the country (13-15). The dissemination of MBLs in Colombia,

5.1 Brief report

particularly VIM-2, has been attributed to the high-risk clone of *P. aeruginosa* of sequence type 111 (ST111) (16). Here we report the first detection of VIM-4 in *Enterobacterales* in South America, in an *Escherichia coli* isolated from rectal swabbing of a patient from a third-level hospital in Antioquia, Colombia.

The male patient from a Colombian rural area had a history of closed fracture of the left tibia, with subsequent osteomyelitis associated with osteosynthesis material and treated initially with ciprofloxacin (initial infectious agent is unknown). The patient was then referred to third-level clinic for orthopedic management and coverage for ulcer plastic surgery. Given the presence of an active ulcer and ciprofloxacin exposition, rectal screening was performed to detect colonization. The results showed growth of *E. coli* (strain C2-70) resistant to carbapenems. Contact isolation measures, including strict hand washing, were implemented during the hospital stay. This report was approved by the Institutional Review Board (IRB) of the hospital.

Bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing performed with Vitek-2 system (bioMérieux Marcy-l'Étoile, France) in the strain isolated revealed resistance to amikacin (MIC, ≥ 64 mg/L), gentamicin (MIC, ≥ 16 mg/L), ciprofloxacin (MIC, ≥ 64 mg/L), ampicillin-sulbactam (MIC, ≥ 32 mg/L), piperacillin-tazobactam (MIC, ≥ 128 mg/L), ceftazidime (MIC, ≥ 64 mg/L), ceftriaxone (MIC, ≥ 64 mg/L), ceftazidime (MIC, ≥ 64 mg/L), cefepime (MIC, 8 mg/L), ertapenem (MIC, 2 mg/L) and imipenem (MIC, 2 mg/L). The minimum inhibitory concentration (MIC) results were interpreted following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints (17). In addition, the boronic acid-based combined disk test, using imipenem, yielded a negative result, and the double-disc synergy test between meropenem and imipenem versus

5.1 Brief report

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) yielded a positive result that indicated the production of an MBL (18). Molecular testing by PCR confirmed that the isolate harbored *bla_{VIM}* gene (19).

Later on, genomic DNA of the strain was extracted with the GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA). DNA libraries were prepared using a NexteraXT index primer kit on the Illumina platform (Illumina, San Diego, CA). Genomic libraries were sequenced on a MiSeq sequencer to obtain 250-bp paired-end reads. The readings were cleaned and assembled by *de novo* assembly using CLC Genomics Workbench, version 8.5. The sequence data from the isolate can be found at the BioProject number PRJNA39150; BioSample number SAMN07291405 in the NCBI GenBank database. The assembly was typed on the web server of the Center for Genomic Epidemiology using the multilocus sequence typing (MLST) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) (20). The determination of resistance elements, the plasmid replicon, and plasmid multilocus sequence type (pMLST) were identified using Resfinder 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (21), plasmid finder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) and pMLST 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/pMLST/>) (22), respectively.

The isolate belonged to ST471 and carried several resistance genes including *bla_{VIM-4}*, *bla_{CTX-M-15}* and *bla_{CMY-2}*, that encode resistance to β -lactams; *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(6')-Ian*, *aadA5*, and *aac(3)-IIa*, that encode resistance to aminoglycosides; *sul1* and *sul2*, that encode resistance to sulfonamides; *dfpA17*, that encodes resistance to trimethoprim; *mph(A)*, that encodes resistance to macrolide; *tet(B)*, that encodes resistance to tetracycline; and *catB3* that encodes resistance to

5.1 Brief report

chloramphenicol. To this isolate belonged three plasmid replicons, including IncA/C, IncFIA, and IncFIB. The IncA/C plasmid was determined to be ST3 at the pMLST.

A BLASTn analysis indicated that the genetic environment of *bla*_{VIM-4} gene in the *E. coli* C2-70 isolate was similar to that previously characterized in *K. pneumoniae* strain KP3686 (accession number GU181265) recovered in Hungary in 2009 (23). The *bla*_{VIM-4} with a 170-bp duplicated region in the last position was part on of a class 1 integron-integrase (*intI1*), and preceded by an *aac(6′)-Ib* gene cassette (Figure 1a). Furthermore, the *qacEDelta1-sul1*-N-acetyltransferase – *tnpA* IS6100 structure was present downstream of the *bla*_{VIM-4} gene (Figure 1a). Of note, we found three contigs from *de novo* assembly of the C2-70 isolate that showed similarities to pKKp4-VIM, an IncA/C-pST3-type plasmid of ~165-kb (accession number MF582638) from a *K. pneumoniae* strain carrying *bla*_{VIM-4}, recovered in Kuwait, a country in Western Asia, and reported in 2017 (10), where at least 76% of the backbone was covered. The contigs showed similarities with three resistance islands that harbored the pKKp4 (RI-1, RI-2 and RI-3) (Figure 1b). Additionally, we characterized the genetic location of *bla*_{VIM-4} by S1-nuclease pulsed-field gel electrophoresis (S1-PFGE) and southern hybridization using a digoxigenin (DIG) DNA-labeled *bla*_{VIM} probe (DIG-High Prime DNA labeling and detection starter kit II; Roche, Germany), following the manufacturer’s instructions (24, 25). Our results indicated that C2-70 isolate carried three plasmids of 121, 145.5 and 291 kb, being the *bla*_{VIM-4} harbored by the 145.5-Kb plasmid (Figure 2).

5.1 Brief report

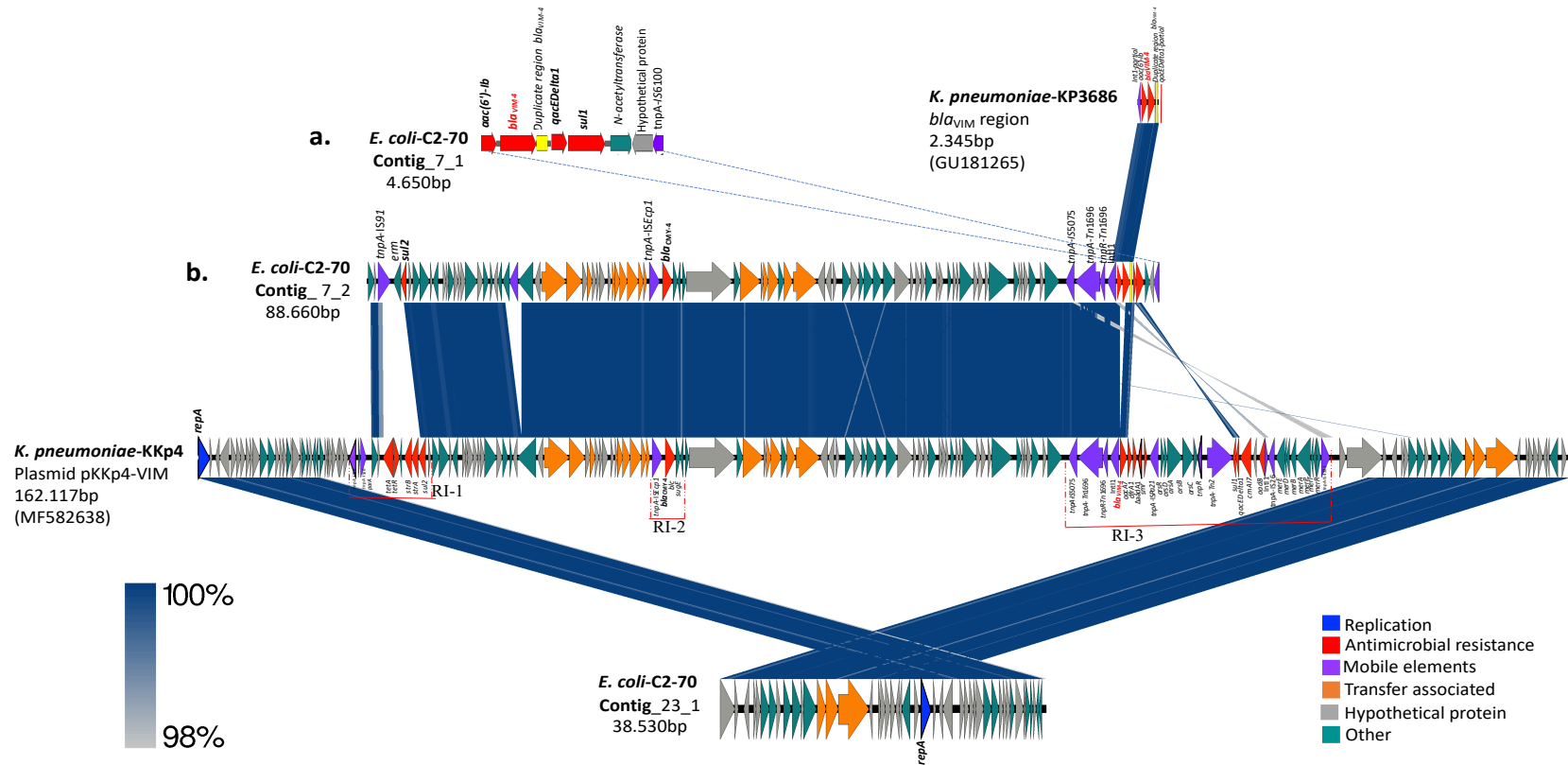


Figure 1. Alignment of the contigs of C2-70 isolate with the *bla*_{VIM-4} region of KP3686 and plasmid pKkp4-VIM using Easyfigure. The degree of genetic similarity between the sequences is depicted by the shaded area, and a scale indicating the degree of similarity is at the bottom left. The arrows represent the direction of transcription. Genes are color-coded depending on functional annotations at the bottom right. (a) Alignment of the region of KP3686 harboring *bla*_{VIM-4} (GU181265) with contig that contained the *bla*_{VIM-4} in C2-70 (contig_7_1). (b). Alignment of the plasmid pKkp4-VIM (MF582638) harboring *bla*_{VIM-4} with contigs 7_2, 23_1 and 7_1 of C2-70 with a 99.9% identity, and 52%, 23% and 1% of coverage, respectively, by BLAST. The RI-1, RI-2 and RI-3 of pKkp4-VIM are also shown (red dotted line).

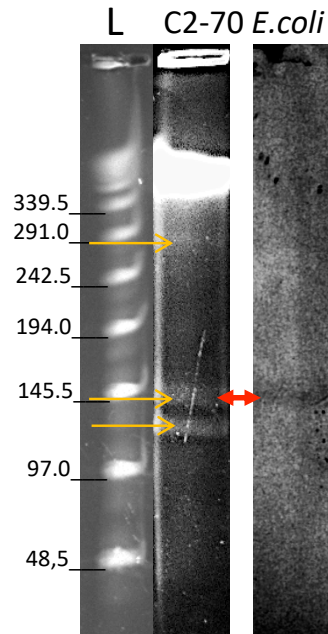


Figure 2. Plasmid location of *bla*_{VIM-4} on isolate C2-70 confirmed by S1-pulsed-field gel electrophoresis (S1-PFGE) and southern hybridization with a *bla*_{VIM} probe. The plasmid bands in S1-PFGE are indicated by yellow arrows (left panel), a lambda ladder was including as reference (L). The plasmid band in which the *bla*_{VIM-4} was detectable by southern hybridization using *bla*_{VIM-4} probe is indicated by a red triangle (right panel).

VIM-producing *Enterobacteriales* has become endemic in some European countries, especially in Greece (7); in contrast, in South America few reports exist. Until now, VIM-2, VIM-11, VIM-16, VIM-23 and VIM-24 variants have been described (11, 26), demonstrating that in some cases the *bla*_{VIM} coding gen was associated to class I integron, an efficient genetic platform to incorporate MBLs genes, and disseminated once it has been embedded within transposons or plasmids (26). To our knowledge, this is the first case report of *E. coli* harboring *bla*_{VIM-4} in South America. Of note, *bla*_{VIM-4} had not been previously reported in Colombia, an endemic country for VIM-2-producing *P. aeruginosa* (16).

5.1 Brief report

The *bla*_{VIM-4} gene is a variant of the *bla*_{VIM-1} that was first detected in *P. aeruginosa* in Greece in 2001 (27), and later VIM-4-producing *P. aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacterales* were reported in other European countries (28-30). Interestingly, in our case we identified a patient without travel records colonized with *E. coli* ST471, a high-risk clone associated with genes encoding carbapenemases (31), carrying an integron-borne *bla*_{VIM-4} gene with a 170-bp duplication in the last position, identical to that previously characterized in *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *A. hydrophila* and *P. aeruginosa* isolates in Hungary (23, 28, 29). Three plasmid replicons were identified for this isolate, including IncA/C genotyped as pST3. BLASTn analysis showed at least a coverage of 76% of the backbone of pKKp4-VIM, an endemic IncA/C-pST3-type plasmid from Kuwait that spread among *Enterobacterales* strains of multiple species (10). The RI-2 was 99% identical to the pKKp4, the RI-3 was similar in the region that contained the IS5075 tnpA - IS5696 tnpR - IS5696 tnpA - In416 - *bla*_{VIM-4} and the *sul2* gene, which is located on RI-1 (Figure 1b). Overall, our results suggest that *bla*_{VIM-4} was on an IncA/C-pST3-type plasmid with respective regions for replication, conjugative transfer and plasmid maintenance that could play a role in the spread of VIM-4 carbapenemase in Colombia.

5.2 REFERENCES

1. Mojica MF, Bonomo RA, Fast W. B1-Metallo- β -Lactamases: Where Do We Stand? *Curr Drug Targets*. 2016; 17(9):1029-50. <https://doi.org/10.2174/1389450116666151001105622>.
2. Boyd SE, Livermore DM, Hooper DC, Hope WW. Metallo- β -Lactamases: Structure, function, epidemiology, treatment options, and the development pipeline. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020; 64(10):e00397-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00397-20>.
3. Zhao WH, Hu ZQ. Acquired metallo- β -lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. *Future Microbiol*. 2015; 10(5):873-87. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.18>.
4. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43(7):1584-90. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.7.1584>.
5. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(4):891-7. <https://doi.org/10.1128/aac.44.4.891-897.2000>.

5.2 References

6. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and characteristics of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother*. 2015; 47(2):81-97. <https://doi.org/10.3947/ic.2015.47.2.81>.
7. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P; European Network on Carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(5):413-31. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x>.
8. Manenzhe RI, Zar HJ, Nicol MP, Kaba M. The spread of carbapenemase-producing bacteria in Africa: a systematic review. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(1):23-40. <https://doi.org/10.1093/jac/dku356>.
9. Sonnevend Á, Ghazawi A, Yahfoufi N, Al-Baloushi A, Hashmey R, Mathew M, Tariq WZ, Pál T. VIM-4 carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in the United Arab Emirates. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(12):E494-6. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12051>.
10. Sonnevend Á, Yahfoufi N, Ghazawi A, Jamal W, Rotimi V, Pál T. Contribution of horizontal gene transfer to the emergence of VIM-4 carbapenemase producer *Enterobacteriaceae* in Kuwait. *Infect Drug Resist*. 2017; 10:469-478. <https://doi.org/10.2147/IDR.S149321>.

5.2 References

11. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017; 15(3):277-297. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268918>.
12. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, Velez JD, Castañeda CR, Recalde M, Livermore DM. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(11):5094-101. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5094-5101.2004>.
13. Villegas MV, Lolans K, del Rosario Olivera M, Suarez CJ, Correa A, Queenan AM, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(1):226-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.226-229.2006>.
14. Montealegre MC, Correa A, Briceño DF, Rosas NC, De La Cadena E, Ruiz SJ, Mojica MF, Camargo RD, Zuluaga I, Marin A, Quinn JP, Villegas MV; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. Novel VIM metallo-beta-lactamase variant, VIM-24, from a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(5):2428-30. <https://doi.org/10.1128/AAC.01208-10>.
15. Rojas LJ, Mojica MF, Blanco VM, Correa A, Montealegre MC, De La Cadena E, Maya JJ, Camargo RD, Quinn JP, Villegas MV. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coharboring KPC

5.2 References

- and VIM carbapenemases in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(2):1101-2. <https://doi.org/10.1128/AAC.01666-12>.
16. Correa A, Del Campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodríguez-Baños M, Perez F, Maya JJ, Rojas L, Cantón R, Arias CA, Villegas MV. Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(4):2421-5. <https://doi.org/10.1128/AAC.03926-14>.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 25th informational supplement– M100-S25. Wayne, PA. CLSI; 2015.
18. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, Petropoulou D, Sofianou D. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(8):1664-71. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq210>.
19. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(3):490-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp498>.
20. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. Multilocus sequence typing of total-genome-

5.2 References

- sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(4):1355-61. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>.
21. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(11):2640-4. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.
22. Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(7):3895-903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>.
23. Kristóf K, Tóth A, Damjanova I, Jánvári L, Konkoly-Thege M, Kocsis B, Koncan R, Cornaglia G, Szego E, Nagy K, Szabó D. Identification of a blaVIM-4 gene in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone and in a *Klebsiella oxytoca* strain in Hungary. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(6):1303-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq133>.
24. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem.* 1995; 226(2):235-40. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1220>.
25. Liu SL, Hessel A, Sanderson KE. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and

5.2 References

- other bacteria. Proc Natl Acad Sci USA. 1993; 90(14):6874-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.14.6874>.
26. Reyes JA, Melano R, Cárdenas PA, Trueba G. Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American *Enterobacteriales*. Braz J Infect Dis. 2020; 24(3):231-238. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.03.002>.
27. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouvelekis LS, Maniatis AN. Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(12):4026-8. <https://doi.org/10.1128/aac.46.12.4026-4028.2002>.
28. Libisch B, Muzslay M, Gacs M, Minárovits J, Knausz M, Watine J, Ternák G, Kenéz E, Kustos I, Rókus L, Széles K, Balogh B, Füzi M. Molecular epidemiology of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas* sp. isolates in Hungary. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50(12):4220-3. <https://doi.org/10.1128/AAC.00300-06>.
29. Libisch B, Giske CG, Kovács B, Tóth TG, Füzi M. Identification of the first VIM metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Aeromonas hydrophila* strain. J Clin Microbiol. 2008; 46(5):1878-80. <https://doi.org/10.1128/JCM.00047-08>.
30. Matsumura Y, Peirano G, Devinney R, Bradford PA, Motyl MR, Adams MD, Chen L, Kreiswirth B, Pitout JDD. Genomic epidemiology of global VIM-producing

5.2 References

Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2017; 72(8):2249-2258.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkx148>.

31. Freitas DY, Araújo S, Folador ARC, Ramos RTJ, Azevedo JSN, Tação M, Silva A, Henriques I, Baraúna RA. Extended spectrum beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria recovered from an Amazonian lake near the city of Belém, Brazil. *Front Microbiol*. 2019; 10:364. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00364>.

6

GENETIC DIVERSITY OF MULTIDRUG-RESISTANT *Pseudomonas aeruginosa* ISOLATES CARRYING *bla*_{VIM-2} AND *bla*_{KPC-2} GENES THAT SPREAD ON DIFFERENT GENETIC ENVIRONMENT IN COLOMBIA

Rada AM, De La Cadena E, Agudelo C, Pallares C, Restrepo E, Correa A, Villegas MV, Capataz C. Genetic Diversity of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Isolates Carrying bla_{VIM-2} and bla_{KPC-2} genes that Spread on Different Genetic Environment in Colombia. Frontiers in Microbiology (Submitted).

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic Gram-negative pathogen with an increase in the frequency of infections caused by multidrug resistant (MDR) and extensively drug resistant (XDR) strains, limiting the available therapeutic options. The most troublesome resistance is the acquisition and production of carbapenemases such as Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamases (VIM) the most frequent and widespread, and the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) which has continuously spread in the last decade. Its dissemination is linked to their location on mobile genetic elements (MGEs). In Colombia, VIM and KPC have been increasing in its frequency showing major successful dissemination. In this article, we molecularly characterized and analyzed the genetic context of *bla*_{VIM} and *bla*_{KPC} in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA) isolates from infected and colonized patients in two tertiary-care hospitals, one in Medellín and the other in a municipality close to Medellín, both areas with high carbapenemase endemicity in Colombia (2013-2015). Using whole-genome sequencing (WGS) we identified a remarkably variety of genetic backgrounds in these MDR *P. aeruginosa* isolates carrying the *bla*_{KPC-2} and *bla*_{VIM-2}. There were a diversity of class 1 integron and variations in the gene cassettes associated to *bla*_{VIM-2}, as well as a possible event of spread of *bla*_{KPC-2} mediated by a plasmid that contained part of the Tn440Ib in one infection case. The dissemination of *bla*_{VIM-2} and *bla*_{KPC-2} in *P. aeruginosa* in this area in Colombia has been strongly influence by successful international clones, carrying these genes and additional determinants of resistance on mobile genetic elements, accompanied by gene rearrangement under an antimicrobial selection pressure. These findings emphasizes the need to implement control strategies based on rational antibiotic use.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, genetic diversity, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{VIM-2}, integron, plasmid.

6.1 INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic Gram-negative pathogen especially in immunocompromised patients capable of causing a wide array of life-threatening infections. In the hospitals, *P. aeruginosa* plays a crucial role in healthcare associate-infections (1). The increasingly frequent infections caused by multidrug resistant (MDR) and extensively drug resistant (XDR) strains with limited therapeutic options are associated with high morbidity and mortality (2, 3). The intrinsic resistance is conferred by low outer membrane permeability, expression of efflux pumps and the production of antibiotic inactivating enzymes. The acquired resistance can occur because of mutational changes or acquisition of resistance genes via horizontal transfer by mobile genetic elements, such as integrons, transposons, or plasmids (3).

In particular, the most troublesome acquired resistance of *P. aeruginosa* is the production of carbapenemases which confer resistance to most commercially available β -lactam. The class B carbapenemases, such as Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamases (VIM) and Imipenem metallo- β -lactamases (IMP) are the most frequent (4). The genes encoding IMP and VIM are located on integrons, which also carry other antibiotics resistance genes favoring their worldwide dissemination (5, 6). *P. aeruginosa* carrying class A carbapenemases such as *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) have become increasingly important due to their continuous dissemination worldwide including Asia and America during the last decade (7 - 10). Its dissemination is facilitated by genes encoded on transposable elements and plasmids (11 - 13). In

Colombia, VIM-producing *P. aeruginosa* was first reported in 2006, followed by *P. aeruginosa* harboring KPC in 2007 (14, 15). The presence of these carbapenemases in high-risk clones identified by multilocus sequence typing (MLST) as sequence type (ST) 111 (ST111) harboring the *bla*_{VIM-2} on a class 1 integron such as In59 (16, 17), as well as the ST308 and ST235 harboring *bla*_{KPC-2} on complete or truncated *Tn4401b* in plasmids or the chromosome maybe the cause of its successful dissemination in Colombia (18, 19).

The study of genetic platforms of *bla*_{VIM} and *bla*_{KPC} in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA) that co-harbor genes conferring resistance to other antibiotics, as well as their wide diversity, is key to understand the role in the dissemination of such resistance determinants among clinical and environmental isolates (11, 16, 18, 19). In this article we molecularly characterized and analyzed the genetic context of *bla*_{VIM} and *bla*_{KPC} in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA) isolates from infected and colonized patients in two tertiary-care hospitals one in Medellín and the other in a municipality close to Medellín, both areas with high carbapenemase endemicity in Colombia (2013-2015).

6.2 MATERIALS AND METHODS

6.2.1 Bacterial isolates and clinical data

A collection of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA) isolates (n=46) from a surveillance study of Carbapenem-resistant Gram-negative bacteria was selected from infected and colonized patients, in two tertiary-care hospitals in Colombia between 2013-2015. Thirty-eight isolates were

6.2 Materials and methods

recovered from the hospital 2 located in a municipality close to Medellin, while the remaining isolates were collected from the hospital 1 located in the city of Medellin (143 and 202 beds, respectively) (see Data set 1). The medical records of infected and colonized patients were reviewed retrospectively. Colonization was defined as a CRPA recovered from a surveillance rectal culture or clinical sample without associated signs or symptoms of disease. Rectal swabs were cultured on a selective chromogenic medium (chromID CARBA; bioMérieux). Infection was defined by an associated clinical syndrome of infection. Colonization and infection were confirmed by the infectious disease services and/or infection control unit. Clinical information such as age, sex, previous hospitalization, days of hospital stay before sampling, use of invasive medical devices, underlying diseases, comorbidities, and antibiotic use, was collected from electronically medical records, and recorded in a Microsoft Access Database. This study was approved by the Institutional Review Board (IRB) and Ethical Committee in each participating hospital.

6.2.2 Identification, antimicrobial susceptibility testing and carbapenemases detection

Species identification and antimicrobial susceptibility testing was performed using automated Vitek-2™ system (bioMérieux Marcy-l'Étoile, France). The antimicrobial agents tested included imipenem, meropenem, doripenem, ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam, gentamicin, amikacin, and ciprofloxacin. The minimum inhibitory concentrations (MIC) results were interpreted following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints 2017 (20). All isolates classified as carbapenem-resistant were tested by PCR assay for the presence of carbapenemases encoding genes including *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* and *bla_{IMP}*. The primers used for

amplification, as well as PCR cycling conditions, have been described elsewhere (21, 22). DNA sequencing was performed on amplification products of positive PCR and the results were compared and aligned with reference sequence using the online BLAST database to identified specific alleles.

6.2.3 Molecular typing and Whole-genome sequencing

The characterization by rep-PCR/DiversiLab™ (bioMérieux Marcy-l'Étoile, France) was conducted in 21 isolates of *P. aeruginosa* carrying the *bla*_{KPC} or *bla*_{VIM} gene that complied with DNA in good quantity and quality pos-extraction to determine the genomic relatedness, using >95% similarity to considered to be of the same rep-PCR-type. A total of 16 isolates were selected for whole-genome sequencing (WGS) based on this initial characterization. Total DNA was extracted with the GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA). DNA libraries were prepared using a NexteraXT® DNA sample preparation kit and multiplexed with a NexteraXT index primer kit on the Illumina platform (Illumina, San Diego, CA). Genomic libraries were sequenced on a MiSeq sequencer to obtain 250-bp paired-end reads using Kit v2 and v3 (Illumina). The readings were processed to eliminate low quality bases and contamination with sequences of adapters and later assembled by *de novo* assembly. Cleaning and assembly were carried out using CLC Genomics Workbench assembler, version 8.5. The genomes were annotated using the RAST server (<http://rast.nmpdr.org>). The assemblies were typed on the web server of the Center for Genomic Epidemiology using the MLST 2.0 (Multilocus Sequence Typing) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) (23).

6.2.3.1 Genome annotation

The determination of resistance elements was identified using Resfinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) (24), using an identity percentage higher than 95% and a coverage cutoff greater than 90%. The *Tn4401* isoforms were determined by BLASTn comparing the region surrounding each *bla_{KPC}* gene to the sequences of the *Tn4401* isoforms as described previously (25). Overlapping sequences that comprised the region surrounding *bla_{VIM}*, the different integrons and gene cassettes were manually confirmed using BLASTn and BLASTp. The identification of the integrons was investigated using INTEGRALL, the reference database of integron sequences (<http://integrall.bio.ua.pt>) (26). Likewise, this database was used for registry and the integron number assignment. Easyfig (<http://mjsull.github.io/Easyfig/>) was used to compare and visualize the backbone of different Mobile Genetic Elements (MGEs). The BLAST Ring Image Generator (BRIG) software (27) was applied to align the assembled reads of some sequenced clinical isolates to one reference plasmid carrying *bla_{KPC}*.

6.2.3.2 Phylogenetic analyses

The phylogenetic reconstruction of the isolates was carried out by detecting single nucleotide polymorphisms (SNP) against reference genome of *P. aeruginosa* PAO1 (accession number NC_002516.2). Also, we included the reference genome of *Pseudomonas putida* K72440 (accession number NC-002947.4) as an external group. A Single Nucleotide Polymorphisms matrix (SNPs matrix) was constructed and used to reconstruct the phylogeny of the strains with RAxML (28). We used the General Time Reversal (GTR) model with a GAMMA distribution and

6.3 Results

Lewis correction for the parameters to determine the best phylogenetic reconstruction by maximum likelihood. We performed 20 runs and chose the one with the best score. In addition, 100 bootstraps were made to support the reconstructions. The trees obtained were visualized by iTOL (29).

6.2.4 Statistical analysis

Comparison of clinical and epidemiological data was performed between colonized and infected patients, as well as between carbapenemase-producing *P. aeruginosa* (CPPA) and non-CPPA isolates. Fisher's exact (2 tails) or chi-square test was used for qualitative variables, and Wilcoxon Rank Sum Test for continuous variables.

Accession numbers. The sequence data for the isolates were submitted to the NCBI GenBank database under BioProject number. PRJNA391501

6.3 RESULTS

6.3.1 Infection and colonization by carbapenem-resistant *P. aeruginosa*

The 46 isolates of CRPA from the two hospitals were recovered from 41 adult patients, 24 (58.5%) were infected and 17 (41.4%) were colonized. Most patients were males (68.3%, n=28) and older adults (median age of 63 years; interquartile rang [IQR] = 49 – 74). The majority of the CRPA isolates from the infected patients were from soft tissue (29.2%, n=7) (see Table S1). In general,

6.3 Results

the most common underlying conditions were hypertension (48.8%, n=20) and diabetes mellitus (24.4%, n=10). A total of 19 patients (46.3%) had previous antibiotic exposure, being the most frequent carbapenems, piperacillin-tazobactam and glycopeptides (12.2% for each, n=5) (see Table S1). Among the isolates recovered, 50% (n=23) were positive for two of the four carbapenemases-encoding genes evaluated by PCR (2 from hospital 1 and 21 from hospital 2). The gene *bla*_{VIM-2}, *bla*_{KPC-2}, and *bla*_{VIM-2} plus *bla*_{KPC-2} were detected in 47.8% (n=11), 47.8% (n=11) and 4.3% (n=1) isolates, respectively. These isolates were obtained from 19 patients, 10 were infected (n=3, *bla*_{VIM-2}; n=7, *bla*_{KPC-2}) and 9 were colonized (n=6, *bla*_{VIM-2}; n=2, *bla*_{KPC-2}; n=1, *bla*_{VIM-2} plus *bla*_{KPC-2}). Two infected patients were previously colonized by VIM-producing *P. aeruginosa* (each patient had 2 isolates). Also, up to three KPC-producing *P. aeruginosa* isolates were collected from different sources in different days from the same infected patient (see Data Set S1).

Of the total of CRPA isolates, 91.3%, 87.0% and 84.8% were resistant to doripenem, meropenem and imipenem, respectively. More than half of the isolates were resistant to piperacillin/tazobactam (73.9%), ciprofloxacin (60.8%), cefepime (58.7%), ceftazidime (56.5%) and gentamicin (56.5%). When comparing between CPPA and non-CPPA, the resistance to gentamicin was higher in CPPA than in non-CPPA. Furthermore, more than half of isolates of both CPPA (86.9%) and non-CPPA (65.2%) were multi-drug resistant (MDR), defined as non-susceptible to at least one antibiotic in three antimicrobial categories (2), being the most frequent resistance amikacin/gentamicin, cefepime, ceftazidime, imipenem, meropenem, doripenem, piperacillin/tazobactam and ciprofloxacin in CPPA (52.2%) (see Table S2).

6.3.2 Diverse genetic background of multidrug-resistant *P. aeruginosa* isolates carrying *bla*_{KPC}/*bla*_{VIM}

The initial characterization of CPPA isolates by rep-PCR/diversilab revealed five different rep-PCR-type, two of them harboring *bla*_{KPC-2} from hospital 2 (2 isolates for each) and three included isolates harboring *bla*_{VIM-2} from hospital 1 and 2 (2 isolates for each); the other isolates were unrelated (see Figure S1). Based on this characterization 16 MDR *P. aeruginosa* isolates were selected for WGS (n=7, *bla*_{KPC-2}; n=9, *bla*_{VIM-2}). The isolates carrying the *bla*_{KPC-2} gene (n=7) recovered from infected patients exhibited a variety of genetic backgrounds, with 5 different sequence type (ST), including the ST309 associated with O-antigen serotype O11 (n=1), the ST308 with O11 serotype (n=2), other isolates belonging to ST313 (n=1) and ST699 (n=2) associated with other serotypes. Additionally, one new ST was designated as ST3512 (n=1) (see Figure 1). The isolates carrying the *bla*_{VIM-2} (n=9) recovered from colonized and infected patients showed 4 different ST profiles, being the most frequent ST111 associated with O12 serotype (n=6), while other isolates belonged to ST1249 (n=1), ST357(n=1) and ST1027 (n=1) (Figure 1). Of note, four isolates ST111 genetically related were recovered from rectal swabs samples and site of infection (soft tissue) from two patients, suggesting the colonization and infection by the same clone of *P. aeruginosa* in each patient. In general, the isolates carried other genes which can confer resistance to several antibiotics, including aminoglycosides, sulfonamides, tetracyclines, quinolones, phenicol, fosfomycin and β -lactam (see Figure 1).

6.3 Results

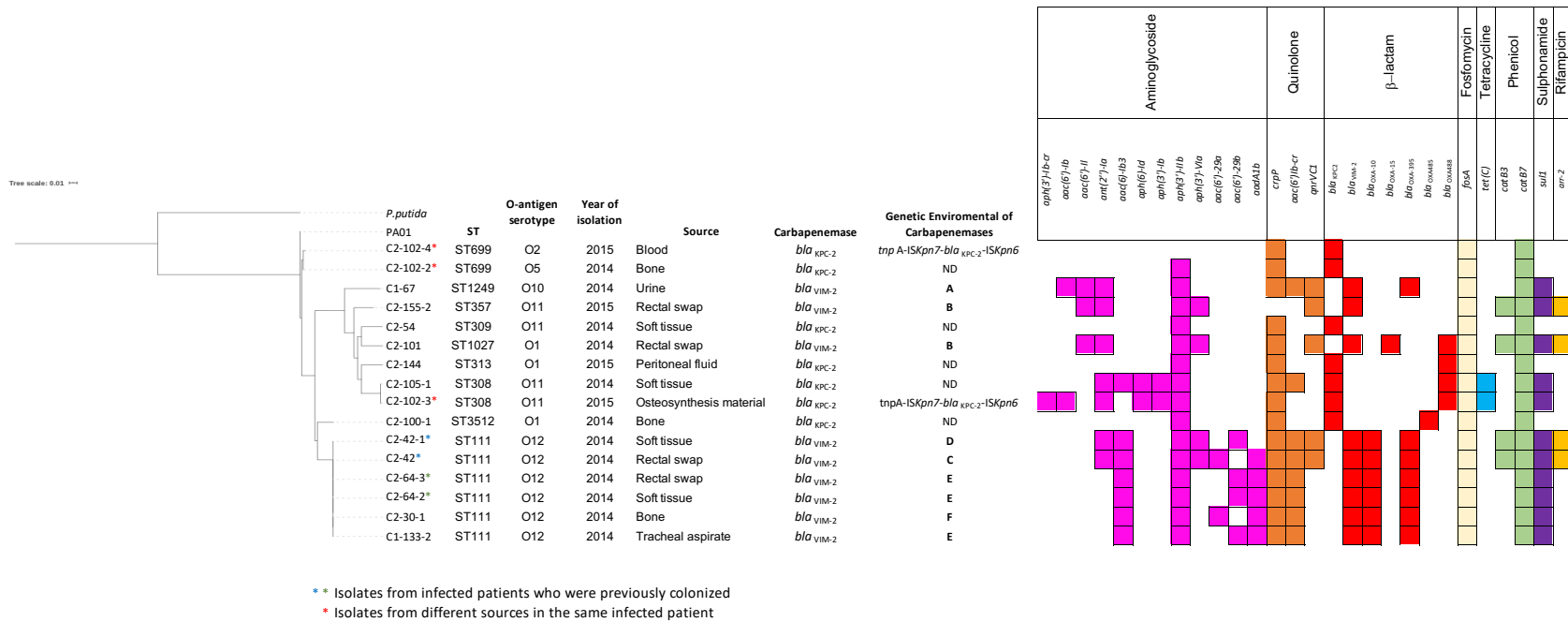


Figure 1. Phylogenetic tree showing the genetic relationships among isolates of *P. aeruginosa* (n=16). Isolates were characterized by ST, O-antigen serotype and year of isolation. We indicate carbapenemases genes *bla*_{KPC-2} or *bla*_{VIM-2} and the genetic environmental identified in each isolate. Resistance determinants to aminoglycoside, quinolone, β -lactam, fosfomycin, tetracycline, phenicol, sulfonamide and rifampicin are grouped and indicated by color (color box indicates presence, blank indicates absence)

6.3.3 Diversity of structures surrounding *bla*_{VIM-2} in *P. aeruginosa* isolates

The *bla*_{VIM-2} gene was associated with six different type of gene cassette arrays encoding resistance to aminoglycosides or chloramphenicol, designated from A to F (see Figure 2). The type E was found in three isolates ST111, the type B in two isolates ST357 and ST1027, and the types A, C, D and F were found in one isolate each, with different STs (type A - ST1249; type C, D and F ST111) (see Figure 1). We found two of these *bla*_{VIM-2} gene cassette arrays within class 1 integrons; the In103 (type A), was first reported in one isolate of *P. aeruginosa* from Portugal, in 2018 (accession number AY954726) (30), and a new integron designated as In1545 (type B) including *bla*_{VIM-2} - *aacA7*- *catB3* - *aadB*- *bla*_{OXA-2Δ}::ISAbA125::*aphA6* gene cassette. In addition, two isolates recovered from the same patient, showed a similar gene cassette to In1545, but differ by the lack of the *aacA7* and presence upstream region of *bla*_{VIM-2} of *aac(6')29a* (type C) in one isolate and *aac(6')29b* (type D) in the other isolate. Furthermore, we found two cassettes arrays (type E and F) similar to a region of In59 previously reported in Colombia (16) (See Figure 2).

Interestingly, in six isolates the class 1 integrons were associated with other gene cassette; the In1237 was detected in one isolate from hospital 2 (C2-42), containing the gene cassette *qnrvc-gcu165-arr2-dfrA22e* which confer resistance to fluoroquinolones, rifampicin and trimethoprim. This integron was previously identified in *P. aeruginosa* in France, in 2016 (accession number KU984332) (31). Also, a new integron designated as In2011 was detected in five isolates (C1-133-2, C2-64-3, C2-64-2, C2-30-1 and C2-42-1) from hospital 1 and 2, containing the gene cassette *gcu183-aacA4'*- *aadA1*_{Δ32} -*bla*_{OXA-10}, which confer resistance to aminoglycosides and β-lactam. This integron carries a gene cassette *gcu183* without a recognized function yet (32). Additionally,

6.3 Results

the gen cassette structure of In1237 and In2011 were detected in three (C2-42-1, C2-155-2, C2-101) and one (C2-42) isolates from hospital 2, respectively.

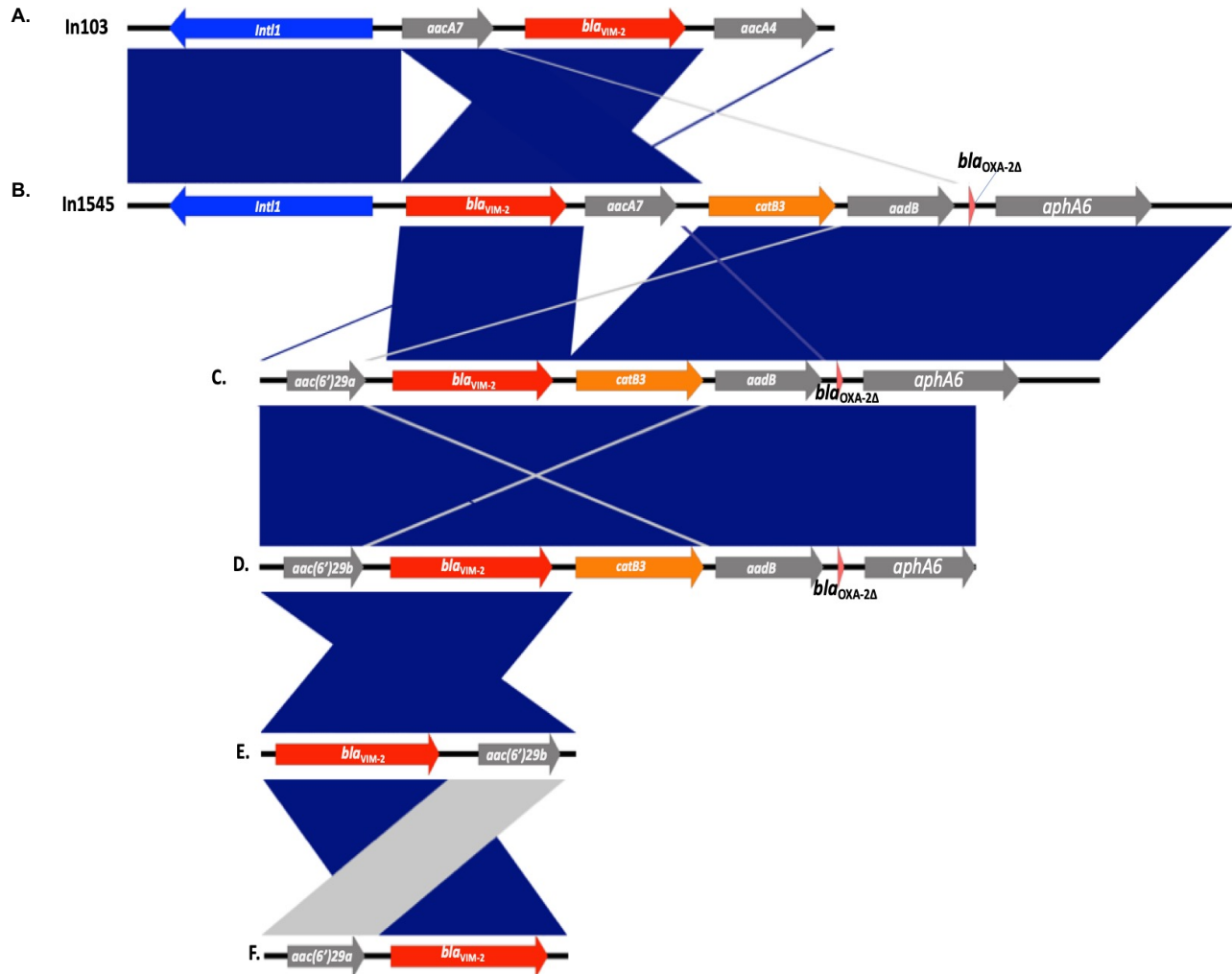


Figure 2. Genetic comparison of the *bla*_{VIM-2}-containing class 1 integrons detected in this study and genetic cassette arrays. Genes are denoted by horizontal arrows with their corresponding transcription orientations. *bla*_{VIM-2} is highlighted in red. Figure was created using EasyFig.

6.3 Results

6.3.4 Transferring a plasmid carrying *bla*_{KPC-2} in a case of infection by *P. aeruginosa*

The *bla*_{KPC-2} gene was not detected in the genome of five isolates of *P. aeruginosa* suggesting the loss of the plasmid or the *bla*_{KPC-2} gen during storage or subculture processing prior to sequencing. However, in two of three isolates recovered from the same patient, the *bla*_{KPC-2} gene was detected in the genome. The strains were isolated from a patient in the hospital 2 with chronic pelvic osteomyelitis with the first strain a MDR *P. aeruginosa* (ST699/C2-102-2 strain). Subsequently, osteomyelitis treatment failed due to retention of osteosynthesis material, with a second isolate of MDR *P. aeruginosa* (ST308/C2-102-3 strain) from the osteosynthesis material. A third relapse of the infectious occurred, and a MDR *P. aeruginosa* (ST699/C2-102-4 strain) was isolates in blood cultures. Timeline of the antimicrobial treatment and bacterial isolates of this case are shown in Figure 3.

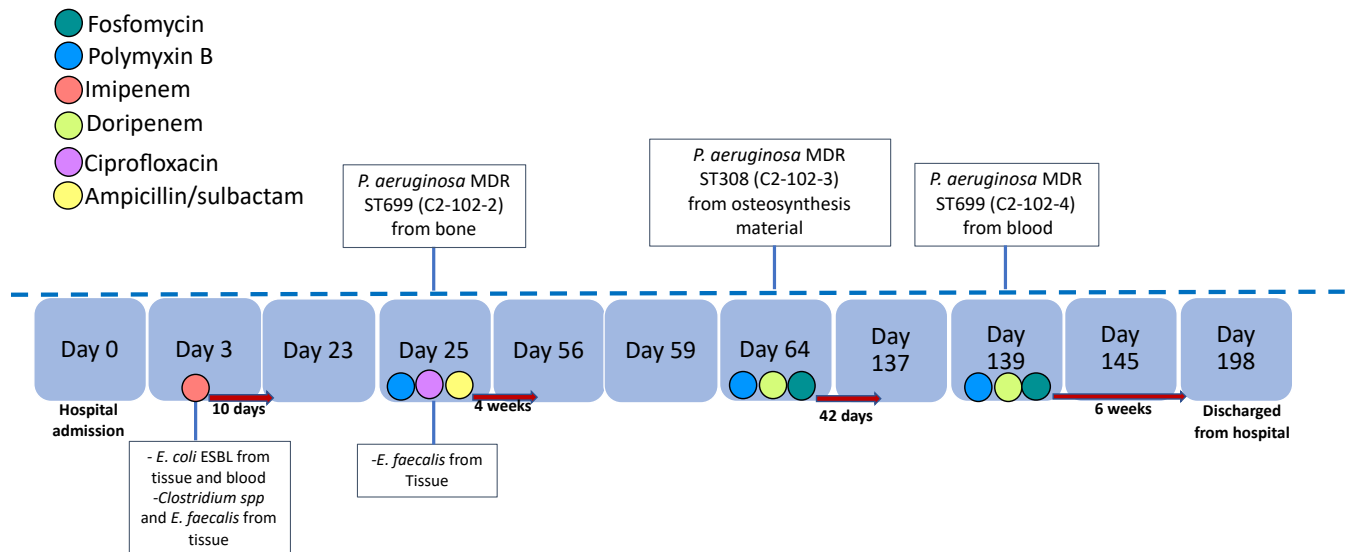


Figure 3 Timeline of antimicrobial treatment and bacterial identification. The antibiotics are indicated by color and the time of treatment with a red arrow to the right. We indicate the bacteria and source of isolation in the day of identification.

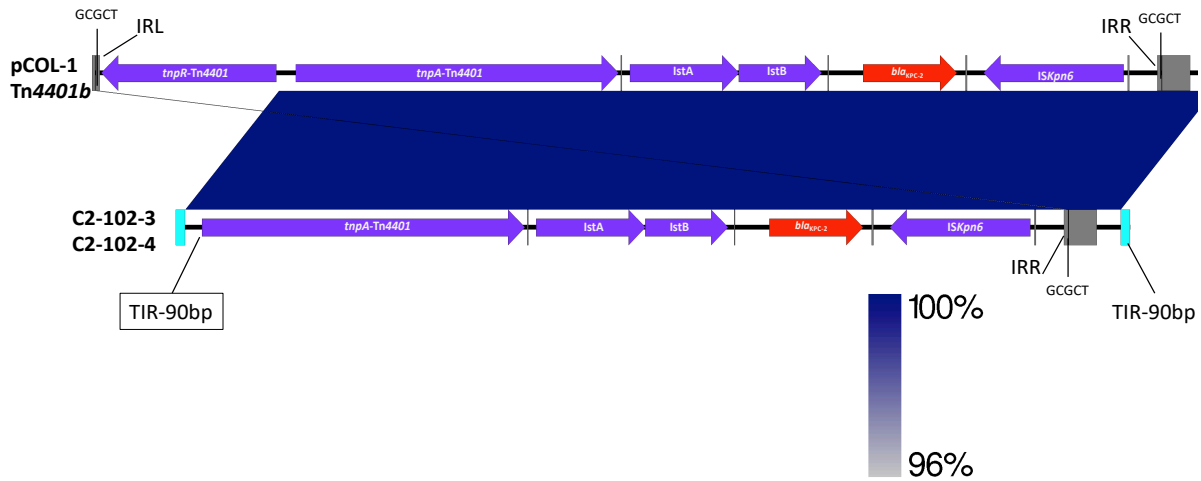
6.3 Results

The isolates recovered from the osteosynthesis material (C2-102-3) and blood (C2-102-4) belonging to ST308 and ST699 carried *crpP*, *fosA* and *catb7* conferring, respectively, quinolone, fosfomycin and chloramphenicol resistance. Additionally, the C2-102-3 isolate carried the *tetC*, *sull1*, *aph(3'')-Ib*, *aac(6')Ib-cr*, *ant(2'')Ia*, *aph(6)-Id* and *aac(6)-Ib3* conferring tetracyclin, sulphonamide and aminoglycoside resistance, respectively (see Figure 1). Also, a new integron was detected and designated as In2012 including *aadB* (*ant(2'')-Ia*) and *aacA4'* (*aac(6)-Ib3*) gene cassette. Despite the different genetic backgrounds, both isolates carried the *bla*_{KPC-2} on a transposon similar to the Tn440Ib identified previously in the pCOL1 plasmid from *P. aeruginosa* COL-1 in Colombia (accession number KC609323.1) (11), without the resolvase gene (*tnpR*). Therefore, the GCGCT target site duplication (TSD) only was detected downstream to *ISKpn6* gene (see Figure 4a). Additionally, the transposon was flanked at both ends by terminal inverted repeats (TIR) of 90bp followed downstream by *tpnR* and upstream *vapC-tnpA-merP-merT-merR* genes.

Interestingly, a blast analysis revealed that 2 and 3 contigs obtained by de novo assembly of the C2-102-3 and C2-102-4 isolates, respectively, showed similarities to the backbone of a plasmid from the *P. aeruginosa* PABCH05 strain recovered in Boston, US (accession number CP056099.1), albeit only the region into the contigs that contained the transposon and surrounding not matched with the plasmid (see Figure 4b). These findings suggest a novel plasmid likely generated through transposition and homologous recombination events. Our finding supports the notion that the *bla*_{KPC-2} gene could have been horizontally transferred by this plasmid between different strains of *P. aeruginosa* in the same patient during the time of infection.

6.3 Results

a.



b.

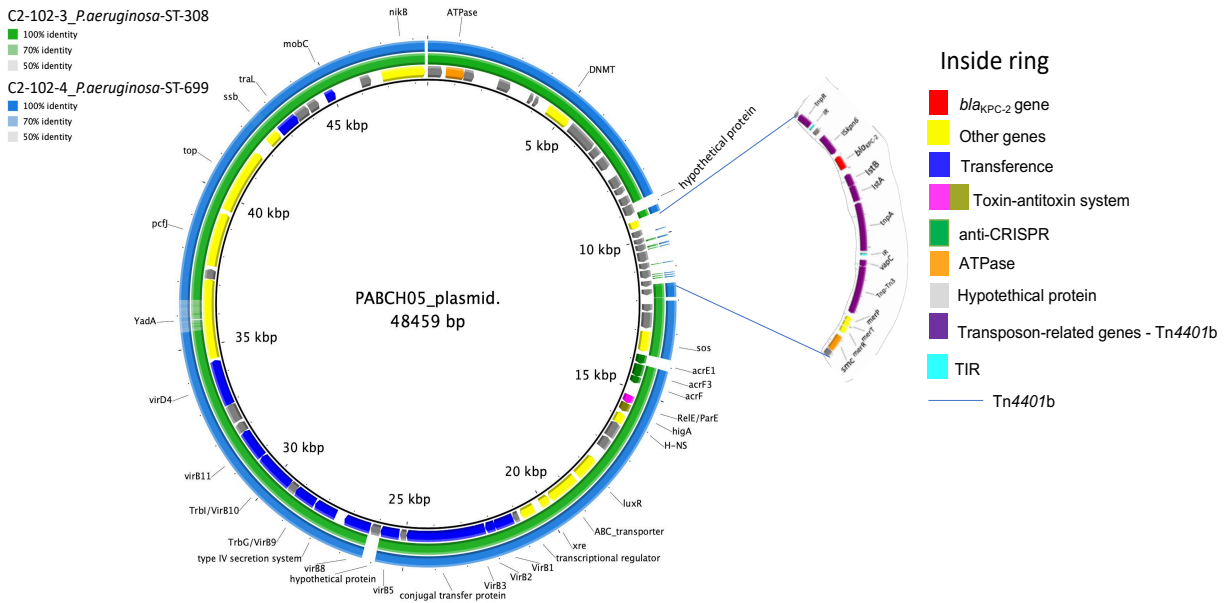


Figure 4(a) Comparison of *Tn4401b* containing *bla_{KPC-2}* gene identified in two isolates of *P. aeruginosa* from a same patient (C2-102-3 and C2-102-4) with isoform *Tn4401b* from *P. aeruginosa* COL-1 from Colombia (accession number KC609323.1) (18). Gray squares represent left and right inverted repeats (IRL and IRR, respectively) delimiting *Tn4401b*, flanked by GCGCT target site duplications (TSD). Genes are denoted by horizontal arrows with their corresponding transcription orientations. Insertion sequences: *Iskpn6* and *Iskpn7* with IRL and IRR sequences (grey line); transposase *tnpA* and resolvase, *tnpR*. (b) BLAST Ring Image Generator (BRIG 0.95 and BLASTN v2.2.29) of comparison of the annotated plasmid from *P. aeruginosa* PABCH05 strain, Boston, US (accession number CP056099.1), with C2-102-3 and C2-102-4 isolates sequenced in this study. The internal ring shows the resistance and structural genes of plasmid of PABCH05 strain indicated by different colors (right panel). Green ring and blue ring correspond to the BLASTn result of C2-102-3 and C2-102-4 contigs relative to the plasmid reference (inside ring), respectively. The *Tn4401b* without the resolvase (*tnpR*) gene and surrounding is indicated by the blue lines. The transposon is flanked at both ends by terminal inverted repeats (TIR) of 90bp followed downstream by *tnpR* and upstream *vapC-Tn3-transposase-merP-merT-merR* genes.

6.4 DISCUSSION

This study provides new data supporting the genetic diversity and differences in the genetic context of *bla*_{VIM-2} and *bla*_{KPC-2} of MDR *P. aeruginosa* isolates recovered from colonized and infected patients from two tertiary care hospitals, one in Medellín and the second located in a municipality close to Medellín, both areas with high carbapenemase endemicity in Colombia. We identified a remarkably variety of genetic backgrounds of *P. aeruginosa* isolates carrying *bla*_{KPC2} or *bla*_{VIM2}, diversity of genetic environmental of *bla*_{VIM}, as well as a possible event of spread of *bla*_{KPC-2} mediated by a plasmid associated with a structure that contained part of the Tn4401b in isolates from an infected case. This molecular heterogeneity suggests the potential of these resistant determinants to disseminate mediated by different MGE in *P. aeruginosa* in Colombia.

According to previous studies in Colombia, *bla*_{VIM} and *bla*_{KPC} have been the most frequently carbapenemase genes detected in *P. aeruginosa* and are widely disseminated in the country (16, 17, 33, 34). In this study we detected equal frequency of isolates of CRPA carrying the *bla*_{VIM-2} and *bla*_{KPC-2} (n=11, 47.8% for each), in contrasts to other countries where *bla*_{VIM-2} is widely spread (5). We detected that most isolates carrying *bla*_{VIM-2} were recovered from colonized patients while *bla*_{KPC-2} was mostly from infected patients. Furthermore, we found one isolate co-harboring *bla*_{KPC-2} and *bla*_{VIM-2} from a patient with urinary tract colonization, which was previously describe in infected patients (16, 17, 35, 36). Studies of molecular characterization in other countries and in Colombia previously focused mainly on infections caused by CPPA (16,17), in contrast to our study where we found colonization with CRPA harboring VIM and KPC, which is major infection control concern (37). Interestingly, all the patients that were colonized by CRPA had a record of

6.4 Discussion

previous hospitalization, and most of them were referred from other hospital localized in different municipalities near to Medellin and more than half had previous antibiotic exposure (see Table S1). Antimicrobial pressure is a risk factor associated with colonization of XDR *P. aeruginosa* in previously studies (38).

Different ST profiles (n=5) were identified among the isolates harboring *bla*_{KPC-2} analyzed by both rep-PCR/diversilab and WGS (n=7). The ST309, is a potential high-risk clone reported in isolates of *P. aeruginosa* from Mexico, carrying *bla*_{KPC-2} and important virulence factors involved in colonization and dissemination, also described in two isolates extensively drug-resistant from US carrying *bla*_{GES-19} and *bla*_{GES-26} (39, 40). The ST308, a clone associated with a higher virulence, was reported before in Colombia and other countries of South America, Europe, Asia, and Oceania (18, 41). The isolates belonging to ST309 and ST308 were associate with the serotype O11, documented in several high-risk clones also (41). Other isolates belonging to ST313 and ST699 were associated with other serotypes, all previously described from different continents, widely disseminated (42-44). Likewise, among the isolates harboring *bla*_{VIM-2} (n=9) various ST profiles (n=4) were identified, with a main lineage ST111 associates with O12 serotype, the second more widespread high-risk clone after ST235, which disseminated in different Colombian cities and has been reported in other countries of America, Europe and Asia (16,17, 41). Interestingly, isolates that belonged to ST111 from rectal swabs and sites of infection from two patients from hospital 2 were genetically related. Other isolates belonged to ST1249 described previously (17), ST357 and ST1027 reported in other countries (45-48). These findings reflect a variety of genetic backgrounds of MDR *P. aeruginosa* isolates carrying *bla*_{KPC2} or *bla*_{VIM2}, due to the dissemination of successful

6.4 Discussion

international clones and emergence of other clones in this area of Colombia, associated to the widespread dissemination mediated by MGEs.

Our analysis of WGS revealed that the *bla*_{VIM-2} was associated with different gene cassette arrays encoding resistance to other antibiotics such as aminoglycosides and chloramphenicol, among isolates with different ST (see Figure 2). Some isolates carried *bla*_{VIM-2}-containing class 1 integrons including In103 (ST1249) and a new integron designated In1545 (ST357 and ST1027) whose cassette genes were detected in two isolates ST111 from the same patient but differ by the lack of the *aacA7*, as well as a different upstream region of *bla*_{VIM-2} for each isolate (see Figure 2), suggesting gene cassette rearrangement. Previously studies demonstrated that under antimicrobial pressure the IntI-mediated rearrangement can generate integron variants (49). Additionally, we found coexistence with infrequent or new integrons with other gene cassette that confer resistance to fluoroquinolones, rifampicin, trimethoprim and β -lactam (In2011 and In1237). This is consistent with previous studies from other countries that showed a high prevalence of class 1 integrons with a high diversity of gene cassette among MDR *P. aeruginosa* isolates (30).

Another important finding in our study are the isolates recovered at different times from the same patient that showed heterogeneous genetic backgrounds but the same location of *bla*_{KPC-2} gene within a transposon similar to Tn440Ib of pCOL1 plasmid (11), without the resolvase (encoded by gene *tnpR*). Supported in the clinical data and blast analysis, we hypothesized that *bla*_{KPC-2} gene could have been horizontally transferred by one plasmid that carried the transposon between different strains of *P. aeruginosa* in the same patient during the infection period (see Figure 3b). There are few reports of *bla*_{KPC} inter- and intra-species transfer within patients (50, 51), but, some

6.4 Discussion

studies have demonstrated *in vivo* acquisition of an insertion sequence or plasmid harboring *bla*_{KPC-2} among *Enterobacteriales* (52). The acquisition also suggests that under antimicrobial pressure transposition of insertion sequences or movement of plasmid among co-infected strains may emerge. In our case these events could have occurred because the patient had broad spectrum antimicrobial therapy and several infection relapses secondary to the osteosynthesis material. Future long read sequencing studies are required to confirm the complete sequence of this plasmid.

Overall, in this study most of the patients colonized and infected by CRPA were older adults (> 63 years old), with different underlying conditions, with various medical devices and broad antibiotic exposure, mainly to carbapenems, piperacillin-tazobactam and glycopeptides (see Table S1). Exposure to broad spectrum antibiotics has been described as the main factor related to carbapenems resistance (53). Furthermore, a multidrug resistance phenotype was detected in more than half of CPPA and non-CPPA isolates; phenomenon locally described only in CPPA (17). These differences might be explained by the inclusion of isolates recovered from rectal swabs in colonized patients in this study, giving the possibility of acquisition of different resistance genes in these isolates because the gastrointestinal tract is the main source of resistant *Enterobacteriales* and can play a key role in the spread of antibiotic resistance by horizontal transmission (37).

Some limitations of this study include that only isolates from two hospitals were analyzed and most of these were collected from a single institution, limiting the extrapolation of the results. On the other hand, five *P. aeruginosa* isolates could have lost the *bla*_{KPC} gene or the plasmid that contained it during storage or sub-culture processing prior to sequencing. Therefore, it was not possible to define the genetic environment of *bla*_{KPC} gene in those isolates.

6.5 CONCLUSIONS

In conclusion, the dissemination of *bla*_{VIM-2} and *bla*_{KPC-2} in *P. aeruginosa* in this area in Colombia has been strongly influenced by successful international clones and emergence of new clones carrying these genes, as well as the presence of resistance determinants in integrons, transposable elements and plasmids, accompanied by gene rearrangement likely through transposition and homologous recombination. We postulate that the antimicrobial pressure may have played an important role. Infection control strategies and rational antibiotic use may help limit the spread. In addition, surveillance of colonization patients may also limit the subsequent infection and dissemination of these bacteria.

6.6 REFERENCES

1. Pachori P, Gothalwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis.* 2019;6(2):109-119. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.04.001>
2. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.
3. Horcajada JP, Montero M, Oliver A, Sorlí L, Luque S, Gómez-Zorrilla S, Benito N, Grau S. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(4):e00031-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>
4. Patel G, Bonomo RA. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2011;9(5):555-570. <https://doi.org/10.1586/eri.11.28>

6.6 References

5. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. Epidemiology and characteristics of metallo- β -Lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother*. 2015;47(2):81-97. <https://doi.org/10.3947/ic.2015.47.2.81>
6. van der Zee A, Kraak WB, Burggraaf A, Goessens WHF, Pirovano W, Ossewaarde JM, Tommassen J. Spread of carbapenem resistance by transposition and conjugation among *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2018;9:2057. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02057>
7. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*. 2015;45(6):568-585. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001>
8. Hu YY, Gu DX, Cai JC, Zhou HW, Zhang R. Emergence of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 463 isolates in Hangzhou, China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(5):2914-2917. <https://doi.org/10.1128/AAC.04903-14>
9. Santella G, Cittadini R, Papalia M, Vera Ocampo C, Del Castillo M, Vay C, Gutkind G, Radice M. First clonal spread of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Buenos Aires, Argentina. *Infect Genet Evol*. 2012;12(8):2003-2005. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.022>

6.6 References

10. Carrara-Marroni FE, Cayô R, Streling AP, da Silva AC, Palermo RL, Romanin P, Venâncio E, Perugini MR, Pelisson M, Gales AC. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. *J Glob Antimicrob Resist*. 2015;3(4):304-306. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2015.07.002>
11. Naas T, Bonnin RA, Cuzon G, Villegas MV, Nordmann P. Complete sequence of two KPC-harbouring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(8):1757-1762. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt094>
12. Dai X, Zhou D, Xiong W, Luo W, Luo G, Wang H, Sun F, Zhou X. The IncP-6 Plasmid p10265-KPC from *Pseudomonas aeruginosa* carries a novel Δ ISEc33-Associated bla KPC-2 Gene Cluster. *Front Microbiol*. 2016;7:310. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00310>
13. Hu YY, Wang Q, Sun QL, Chen GX, Zhang R. A novel plasmid carrying carbapenem-resistant gene *bla*_{KPC-2} in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Drug Resist*. 2019;12:1285-1288. <https://doi.org/10.2147/IDR.S196390>
14. Villegas MV, Lolans K, del Rosario Olivera M, Suarez CJ, Correa A, Queenan AM, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(1):226-229. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.226-229.2006>

6.6 References

15. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1553-1555. <https://doi.org/10.1128/AAC.01405-06>
16. Correa A, Del Campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodríguez-Baños M, Perez F, Maya JJ, Rojas L, Cantón R, Arias CA, Villegas MV. Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(4):2421-2425. <https://doi.org/10.1128/AAC.03926-14>.
17. Vanegas JM, Cienfuegos AV, Ocampo AM, López L, del Corral H, Roncancio G, Sierra P, Echeverri-Toro L, Ospina S, Maldonado N, Robledo C, Restrepo A, Jiménez JN. Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia. *J Clin Microbiol.* 2014;52(11):3978-86. <https://doi.org/10.1128/JCM.01879-14>.
18. Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing beta-lactamase *bla*_{KPC-2} gene in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(11):5350-3. <https://doi.org/10.1128/AAC.00297-11>.
19. Abril D, Marquez-Ortiz RA, Castro-Cardozo B, Moncayo-Ortiz JI, Olarte Escobar NM, Corredor Rozo ZL, Reyes N, Tovar C, Sánchez HF, Castellanos J, Guaca-González YM, Llanos-Uribe CE, Vanegas Gómez N, Escobar-Pérez J. Genome plasticity favours double

6.6 References

- chromosomal Tn4401b-*bla*_{KPC-2} transposon insertion in the *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):45. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1418-6>.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 27th informational supplement– M100-S27. CLSI, Wayne, PA. 2017.
21. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(3):490-5. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp498>.
22. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem- hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45:1151–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
23. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1355-61. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>.
24. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, Aarestrup FM, Larsen MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2640-4. <https://doi.org/10.1093/jac/dks261>.

6.6 References

25. Naas T, Cuzon G, Truong HV, Nordmann P. Role of ISKpn7 and deletions in blaKPC gene expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4753-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.00334-12>.
26. Moura A, Soares M, Pereira C, Leitão N, Henriques I, Correia A. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics.* 2009;25(8):1096-8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp105>.
27. Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics.* 2011;12:402. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402>.
28. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014;30(9):1312-3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
29. Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W242-5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>.
30. Botelho J, Grosso F, Quinteira S, Brilhante M, Ramos H, Peixe L. Two decades of blaVIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* dissemination: an interplay between mobile genetic

6.6 References

- elements and successful clones. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(4):873-882. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx517>.
31. Janvier F, Otto MP, Jové T, Mille A, Contargyris C, Meaudre E, Brisou P, Plésiat P, Jeannot K. A case of multiple contamination with methylase ArmA-producing pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(2):618-620. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw418>.
32. Liapis E, Bour M, Triponney P, Jové T, Zahar JR, Valot B, Jeannot K, Plésiat P. Identification of diverse integron and plasmid structures carrying a novel carbapenemase among *Pseudomonas* species. *Front Microbiol.* 2019;10:404. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00404>.
33. Pacheco R, Osorio L, Correa AM, Villegas MV. Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen *bla_{KPC}* en hospitales de Colombia. *Biomédica.* 2014;34(Suppl 1):81–90. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1642>.
34. Saavedra S, Duarte C, González MN, Realpe ME. Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas en siete departamentos de Colombia. *Biomédica.* 2014; 34(Suppl 1):217– 223. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1685>.
35. Correa A, Montealegre MC, Mojica MF, Maya JJ, Rojas LJ, De La Cadena EP, Ruiz SJ, Recalde M, Rosso F, Quinn JP, Villegas MV. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate

6.6 References

- coharboring KPC and VIM carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(10):5422-3. <https://doi.org/10.1128/AAC.00695-12>.
36. Pacheco T, Bustos-Cruz RH, Abril D, Arias S, Uribe L, Rincón J, García JC, Escobar-Perez J. *Pseudomonas aeruginosa* Coharboring *bla*_{KPC-2} and *bla*_{VIM-2} Carbapenemase Genes. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(3):98. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030098>.
37. Abdalhamid B, Elhadi N, Alabdulqader N, Alsamman K, Aljindan R. Rates of gastrointestinal tract colonization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals in Saudi Arabia. *New Microbes New Infect.* 2016;10:77-83. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2016.01.014>.
38. Buhl M, Peter S, Willmann M. Prevalence and risk factors associated with colonization and infection of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(9):1159-1170. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1064310>
39. Morales-Espinosa R, Delgado G, Espinosa LF, Isselo D, Méndez JL, Rodriguez C, Miranda G, Cravioto A. Fingerprint Analysis and Identification of Strains ST309 as a Potential High Risk Clone in a *Pseudomonas aeruginosa* population isolated from children with bacteremia in Mexico City. *Front Microbiol.* 2017;8:313. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00313>.
40. Khan A, Tran TT, Rios R, Hanson B, Shropshire WC, Sun Z, Diaz L, Dinh AQ, Wanger A, Ostrosky-Zeichner L, Palzkill T, Arias CA, Miller WR. Extensively Drug-

6.6 References

- Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST309 Harboring Tandem Guiana Extended Spectrum β -Lactamase Enzymes: A Newly Emerging Threat in the United States. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(7):ofz273. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz273>.
41. Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Oliver A. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;56(6):106196. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106196>.
42. Libisch B, Watine J, Balogh B, Gacs M, Muzslay M, Szabó G, Füzi M. Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary. *Res Microbiol.* 2008;159(3):162-8. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.008>.
43. Cholley P, Ka R, Guyeux C, Thouverez M, Guessennnd N, Ghebremedhin B, Frank T, Bertrand X, Hocquet D. Population structure of clinical *Pseudomonas aeruginosa* from West and Central African countries. *PLoS One.* 2014;9(9):e107008. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107008>.
44. Ji J, Wang J, Zhou Z, Wang H, Jiang Y, Yu Y. Multilocus sequence typing reveals genetic diversity of carbapenem- or ceftazidime-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(11):5697-700. <https://doi.org/10.1128/AAC.00970-13>.

6.6 References

45. Nawfal Dagher T, Al-Bayssari C, Diene SM, Azar E, Rolain JM. Emergence of plasmid-encoded VIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples in Lebanon. *New Microbes New Infect.* 2019;29:100521. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100521>.
46. Hrabák J, Cervená D, Izdebski R, Duljasz W, Gniadkowski M, Fridrichová M, Urbásková P, Zemlicková H. Regional spread of *Pseudomonas aeruginosa* ST357 producing IMP-7 metallo- β -lactamase in Central Europe. *J Clin Microbiol.* 2011;49(1):474-5. <https://doi.org/10.1128/JCM.00684-10>.
47. Horna G, Amaro C, Palacios A, Guerra H, Ruiz J. High frequency of the *exoU*⁺/*exoS*⁺ genotype associated with multidrug-resistant "high-risk clones" of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. *Sci Rep.* 2019;9(1):10874. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47303-4>.
48. Khan M, Stapleton F, Summers S, Rice SA, Willcox MDP. Antibiotic resistance characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from keratitis in Australia and India. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(9):600. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090600>.
49. Barraud O, Ploy MC. Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements Selected under Antibiotic Pressure. *J Bacteriol.* 2015;197(13):2171-2178. <https://doi.org/10.1128/JB.02455-14>.

6.6 References

50. Adler A, Khabra E, Paikin S, Carmeli Y. Dissemination of the *bla*_{KPC} gene by clonal spread and horizontal gene transfer: comparative study of incidence and molecular mechanisms. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2143-6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw106>.
51. Goren MG, Carmeli Y, Schwaber MJ, Chmelnitsky I, Schechner V, Navon-Venezia S. Transfer of carbapenem-resistant plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in patient. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(6):1014-7. <https://doi.org/10.3201/eid1606.091671>.
52. Ding B, Shen Z, Hu F, Ye M, Xu X, Guo Q, Wang M. *In vivo* Acquisition of Carbapenemase Gene *bla*_{KPC-2} in Multiple Species of *Enterobacteriaceae* through Horizontal Transfer of Insertion Sequence or Plasmid. *Front Microbiol.* 2016;7:1651. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01651>.
53. Richter SE, Miller L, Needleman J, Uslan DZ, Bell D, Watson K, Humphries R, McKinnell JA. Risk factors for development of carbapenem resistance among Gram-negative rods. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(3):ofz027. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz027>.

7

DISCUSIÓN GENERAL

7.1 DISCUSIÓN

En esta tesis se caracterizaron molecularmente aislamientos clínicos de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas, provenientes de pacientes infectados y colonizados en tres hospitales de tercer nivel localizados en Medellín y municipios cercanos en Antioquia, Colombia, en el periodo comprendido entre 2013 y 2015. Mediante la secuenciación del genoma completo se demostró la rápida y amplia diseminación de carbapenemasas de tipo KPC-2 intra y entre especies de *Enterobacterales*, así como VIM-2/KPC-2 en clones exitosos de *P. aeruginosa*; la cual fue facilitada por diferentes elementos genéticos móviles extremadamente dinámicos. Igualmente, se identificó por primera vez en Sur América la metalo-betalactamasa tipo VIM-4 en *Enterobacterales*, en un clon de alto riesgo de *E. coli* (ST471), cuyo gen fue portado en un plásmido.

En la última década, se ha dado un aumento dramático en el número de bacterias Gram negativas MDR, tanto en Colombia como en todo el mundo, con especial preocupación por el desarrollo de la resistencia a carbapenémicos dado principalmente por la producción de carbapenemasas, lo cual es relevante ya que este tipo de antibióticos son usados para el tratamiento de infecciones graves, limitando las opciones terapéuticas (1). Los estudios iniciales de la difusión de betalactamasas se comenzaron a conocer en Latinoamérica a partir de 1990, especialmente las enzimas tipo BLEE en *Enterobacterias*. Algunas de ellas originadas en este continente. Posteriormente se dio la aparición y diseminación de carbapenemasas en especial las KPC, VIM, NDM y OXA-48 en *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Colombia es un país endémico para estas enzimas y hay una gran preocupación por el incremento en su frecuencia, por la rápida propagación

7.1 Discusión

mediante elementos genéticos móviles y por la aparición en clones exitosos, con implicaciones en el manejo clínico de infecciones graves (1).

Un estudio previo desarrollado en el país demostró que la epidemia de *bla*_{KPC2} fue conducida por la diseminación horizontal de este gen mediada por elementos genéticos móviles, lo que generó la propagación entre *Enterobacterales* y *P. aeruginosa*, seguido de la introducción y subsecuente diseminación del grupo clonal 258 (GC258) de *K. pneumoniae* con sus principales tipos de secuencia (ST) ST258 y ST512, asociados a múltiples brotes por *bla*_{KPC} alrededor del mundo (2,3). En el trabajo realizado y condensado en esta tesis se evidencia que el mecanismo de diseminación de *bla*_{KPC-2} en un área endémica de Colombia está mediado principalmente por plásmidos promiscuos asociados a elementos transponibles. Esto ocasionó un brote multiespecie y un alto nivel de diversidad genética de *Enterobacterales* productores de *bla*_{KPC-2}. De acuerdo con observaciones previas, los aislados de *K. pneumoniae* pertenecientes a CG258 y portadores de *bla*_{KPC-3} también circularon simultáneamente, creando una “tormenta perfecta” para la diseminación de la resistencia a los carbapenémicos en Colombia (2).

Teniendo en cuenta los datos clínicos de los pacientes infectados y colonizados por *Enterobacterales* productores de *bla*_{KPC-2} y los análisis de secuenciación de genoma de estos microorganismos, se pudo reconstruir el evento de diseminación de este gen, que estuvo mediado por dos plásmidos diferentes de tipo IncN-ST15 que circularon en la unidad de adultos y neonatos del hospital 1, entre linajes de *K. pneumoniae* no-CG258 y diferentes especies de *Enterobacterales* de pacientes infectados y colonizados durante tres años; así como la circulación de uno de estos en otra institución hospitalaria (hospital 2). El primer plásmido conjugativo estuvo involucrado en

7.1 Discusión

un brote neonatal (pIncN_C1-94_KPC) portando el gen *bla*_{KPC-2} en un nuevo transposón Tn4401b con una inserción en el IS*Kpn6* del Tn5403, este último identificado previamente en aislamientos ambientales (4). El segundo plásmido tipo IncN similar a pECC881 (5), portó el *bla*_{KPC2} en un elemento no-Tn4401b, con una inserción del Tn5403 en el *tnpA*(Tn3) en algunos aislamientos.

Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que demuestran brotes por múltiples especies de *Enterobacteriales* productores de KPC mediados por plásmidos de amplio rango de hospedador, específicamente de tipo IncN (6), lo cual adiciona mayor complejidad al manejo de estos en el ámbito hospitalario, pues se ha evidenciado que los plásmidos durante los brotes pueden recombinarse, variar dentro y entre pacientes. Esto permite la adquisición de otros elementos genéticos en el contenido de plásmido y que pueden estar influenciados por la interacción con algunos factores tanto del huésped como la exposición de antibióticos (7).

Es así como en este estudio se sugieren varios eventos que pudieron ocurrir; uno de ellos, la generación del nuevo Tn4401b a través de la inserción de Tn5403 en la secuencia IS*Kpn6*, lo cual pudo ser mediado inicialmente por la recombinación homóloga entre plásmidos provenientes de aislamientos ambientales adaptados al hospital y aislamientos clínicos. Las especies en entornos hospitalarios (por ejemplo, aguas residuales) pueden portar genes de resistencia y estar asociados con elementos móviles, lo que podría dejar la transmisión a especies clínicamente significativas (8); la confirmación de estos datos será útil para el diseño de estrategias de control de infecciones sobre la limpieza, desinfección y control en los entornos hospitalarios. Adicionalmente, sugerimos posibles eventos de transposición del Tn5403 facilitando reordenamientos del ADN plasmídico que pudieron darse durante la colonización de los pacientes; eventos que han sido descritos en

7.1 Discusión

estudios previos donde se analizó la evolución de plásmidos durante el seguimiento de pacientes con colonización persistente (7). A pesar de que el Tn5403 solo contiene genes relacionados con funciones de transposición y se describe que juega un papel “disruptivo” o de “reorganización”, vía transposición dentro de los plásmidos de aislamientos clínicos (4), sería importante determinar qué efectos podrían tener dichos cambios relacionados con alguna ventaja o desventaja frente a la diseminación del transposón/*bla*_{KPC-2} en el que se insertaron.

Así mismo, en los pacientes adultos y neonatos que presentaron co-colonización por diferentes *Enterobacterales*, los análisis de secuenciación de genoma completo refirieron posibles eventos de diseminación horizontal de *bla*_{KPC-2} entre especies a través del plásmido pIncN_C1-94_KPC, en el tracto gastrointestinal de estos pacientes. Esto concuerda con estudios previos que indican que la co-colonización con diferentes aislados de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas (EPC), se da más frecuentemente como resultado de transferencia horizontal de genes entre especies que la adquisición secuencial de diferentes aislados de EPC, lo que probablemente aumenta con la exposición a antibióticos (9).

Otro de los hallazgos importantes en la caracterización genómica de *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos, fue la detección de *bla*_{VIM-4} en una cepa de *E. coli* MDR que perteneció al ST471, un clon de alto riesgo asociado con genes que portan carbapenemasas (10). La cepa fue aislada de un cultivo de vigilancia (hisopado rectal) de un paciente remitido de un hospital de área rural, con una osteomielitis asociada a material de osteosíntesis, el cual fue tratado inicialmente con ciprofloxacina. El *bla*_{VIM-4} presentó una región de duplicación y fue parte de un integron Clase 1, cuya estructura era similar a la reportada en otros aislamientos de bacilos Gram negativos VIM-

7.1 Discusión

4 en Hungría (11). Adicionalmente, se comprobó la localización plasmídica del gen (~145.5-Kb) mediante S1-PFGE, y los análisis por BLAST a partir del genoma ensamblado del aislamiento mostraron una estructura similar al plasmido pKKp4-VIM (IncA/C, pST3) reportado previamente en Kuwait, Asia (12); el cual albergaba tres islas con genes de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos, sulfonamidas, trimetoprim y cloranfenicol. Es importante señalar que el paciente no tuvo registros previos de viaje, y provenía de un área rural del país (municipio de Cauca-subregión del Bajo cauca, Antioquia). En general, nuestros resultados sugieren que el uso de antibiótico previo podría haber favorecido la selección de colonización de *P. aeruginosa* productora de VIM-4 en este paciente, así como, el plásmido detectado jugar un papel en la diseminación de esta enzima en Colombia. Esto demuestran la importancia de los cultivos de vigilancia complementado con el aislamiento inmediato del paciente, como estrategia eficaz para evitar la propagación de organismos productores de carbapenemasas que pueden, no solo tener capacidad de transferencia, sino ser de rango amplio de hospedador, pues se pueden diseminar sin barrera de género y ser candidatos para diseminar la multiresistencia entre bacterias y originar fácilmente brotes en el entorno hospitalario.

Por otro lado, la caracterización molecular de aislamientos de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenémicos de pacientes colonizados e infectados en dos de los hospitales de estudio, permitió identificar la misma frecuencia de aislamientos portadores de *bla*_{VIM-2} y *bla*_{KPC-2}, similar a lo que se reporta en estudios previos en la región (13). Sin embargo, esta investigación se diferencia por la inclusión de aislamientos de pacientes colonizados, que en su mayoría portaron el gen *bla*_{VIM-2}, lo cual es una de las principales preocupaciones del grupo de control de infecciones. Esto sugiere

7.1 Discusión

la importancia de mantener la vigilancia activa en este grupo de pacientes como medida para limitar la posterior infección y diseminación de estas bacterias.

Adicionalmente, el análisis de secuenciación de genoma completo permitió identificar el entorno genético de este gen, el cual se asoció con 6 matrices diferentes de cassettes de genes en aislamientos recuperados tanto en pacientes colonizado como infectados de ambos hospitales. Interesantemente, algunos compartieron la misma estructura, y otros tuvieron variaciones, aun siendo aislados del mismo linaje. También se detectó en algunos aislados el gen *bla_{VIM-2}* asociado con integrones clase 1 y la coexistencia con otros cassettes de genes que confieren resistencia a fluoroquinolonas, rifampicina, trimetoprim y beta-lactámicos; algunos de ellos fueron reportados previamente, otros fueron designados por primera vez en este estudio, lo cual es consistente con investigaciones realizadas en otros países que demuestran una alta diversidad de integrones asociados a *bla_{VIM-2}* (14, 15). Esta variabilidad podría ser explicada por la exposición previa de antibióticos, que fue reportada en más de la mitad de los aislamientos de pacientes colonizados. Estudios previos demuestran que, bajo presión selectiva de antibióticos, se presenta un reordenamiento en las estructuras de integrones y variaciones en el contenido de los cassette de genes (16).

Por último, la secuenciación de genoma completo reveló una variedad de antecedentes genéticos en los aislamientos de *P. aeruginosa* que portaron *bla_{KPC-2}* o *bla_{VIM-2}*, con la diseminación de clones internacionales exitosos reportados previamente en el país, y otros reportados por primera vez. Adicionalmente, dos aislamientos recuperados en un caso de infección de un mismo paciente sugirieron un posible evento de diseminación de *bla_{KPC-2}* mediada por un plásmido que contenía

7.1 Discusión

parte del Tn440Ib reportando previamente en Colombia; evento que ha sido demostrado mayormente en *Enterobacterales* (17). Hasta donde sabemos, este es el primer estudio genómico que se centra en el análisis tanto de pacientes colonización como infectados por aislamientos de *P. aeruginosas* productoras de carbapenemasas en Colombia.

8

CONCLUSIONES

8.1 CONCLUSIONES

En general, en esta tesis los análisis de caracterización molecular mediante secuenciación de genoma completo de bacterias Gram negativas productoras de carbapenemasas en un área de alta endemicidad definen diferentes circunstancias. Primero, la diseminación de carbapenemasas de tipo KPC en esta área de Colombia está impulsada por la transferencia horizontal de plásmidos promiscuos que albergan el gen *bla*_{KPC-2}, fenómeno que generó un brote multiespecie y una amplia diseminación de plásmidos en diferentes unidades de un hospital y entre hospitales. Segundo, el alto nivel de diversidad genética en *Enterobacteriales* productores de KPC-2 y *P. aeruginosa* productora de KPC-2 y VIM-2 en pacientes colonizados e infectados, ha sido fuertemente influenciado por la circulación de clones exitosos, así como por la dinámica de elementos genéticos móviles como integrones, transposones y plásmidos que portan los genes que codifican estas enzimas, y que, bajo presión de antibióticos y el ambiente de la microbiota intestinal en pacientes colonizados, pueden sufrir eventos de reordenamientos, transposición o recombinación homóloga para ser diseminados ampliamente. Lo anterior, origina un desafío para las intervenciones de salud pública en el control de transmisión mediada por estos elementos. Tercero, es fundamental la implementación de protocolos de vigilancia y seguimiento de pacientes colonizados como estrategia para limitar la diseminación y posterior infección por este tipo de bacterias. Cuarto, es necesario implementar estrategias de control basadas en el uso racional de antibióticos.

9

APORTES CIENTÍFICOS Y PERSPECTIVAS

9.1 APORTES CIENTÍFICOS

Esta investigación permitió el mejoramiento en la calidad de la prestación del servicio en los hospitales de estudio. Así mismo, las medidas de control epidemiológico implementadas en cada hospital permitieron:

- El control de un brote por *Enterobacteriales* productores de KPC en la unidad de neonatos del hospital 1.
- El control de la diseminación de cepas de *P. aeruginosa* productoras de KPC y VIM, mediante la rápida detección de los genes que codifican para estas enzimas en el hospital 2.
- La implementación de protocolos de vigilancia y seguimiento de pacientes colonizados en el hospital 3.
- La socialización de los resultados a los grupos de control de infecciones de diferentes instituciones hospitalarias.
- A la comunidad científica le permitirá mejorar la toma de decisiones, orientar las medidas efectivas de prevención y control de infecciones, y de esta manera, establecer protocolos de tratamiento adecuado basados en la epidemiología local de cada hospital.

9.2 PERSPECTIVAS

- Realizar la secuenciación de lectura larga en algunos aislamientos del estudio para confirmar algunos de los supuestos planteados en la investigación.
- Realizar estudios de caracterización genómica de bacterias productoras de carbapenemasas en otras regiones no exploradas en Antioquia.

9. Aportes científicos y perspectivas

- Proponer nuevos proyectos que evalúen la dinámica de la microbiota intestinal y bacterias MDR, en pacientes colonizados mediante técnicas de secuenciación de nueva generación.

ANEXOS

ANEXO

A

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Rada AM, De La Cadena E, Agudelo C, Capataz C, Orozco N, Pallares C, Dinh AQ, Panesso D, Ríos R, Diaz L, Correa A, Hanson BM, Villegas MV, Arias CA, Restrepo E. Dynamics of bla_{KPC-2} dissemination from non-CG258 Klebsiella pneumoniae to other Enterobacterales via IncN plasmids in an area of high endemicity. Antimicrob Agents Chemother 2020;64:e01743-20.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01743-20>

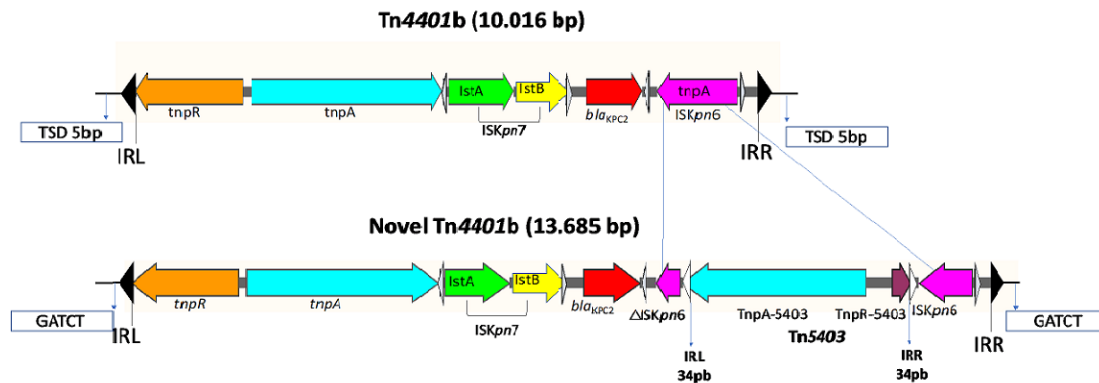


Figure S1 Schematic representation of the novel Tn4401b (13.685 bp) containing *bla_{KPC-2}*, showing common structures with isoform Tn4401b (10.016 bp). Black triangles represent left and right inverted repeats (IRL and IRR, respectively) delimiting Tn4401, flanked by 5 bp target site duplications (TSD). Genes are denoted by horizontal arrows with their corresponding transcription orientations. Insertion sequences: *Iskpn6* and *Iskpn7* with IRL and IRR sequences (grey triangles); transposase *tnpA* and resolvase, *tnpR*. The novel Tn4401b exhibiting an insertion of the Tn5403 element delimited by 34pb of IRL and IRR (white triangles) into *Iskpn6* element and flanked by a GATCT target site duplications.

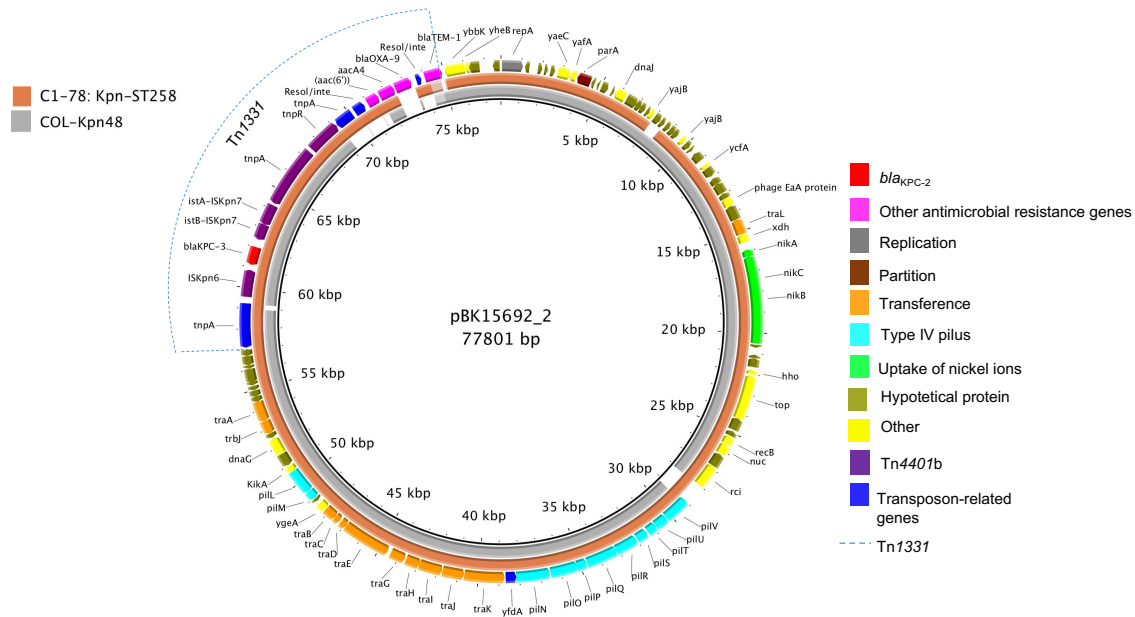


Figure S2 Comparison of the annotated plasmid of reference pBK15692 (accession number: NC_022520.1) harboring *bla*_{KPC-3} (New York/ New Jersey, 2005) with C1-78 isolate sequenced in this study and COL-Kpn48 isolate from Colombia, 2007 (NZ_NCNA00000000.1). The outmost ring shows the resistance genes, as well as the structural genes of pBK15692 indicated by different colors (right panel). Orange ring and gray ring corresponds to the BLASTn result of C1-78 and COL-Kpn48 contigs relative to the pBK15692 plasmid reference (inside ring), respectively.

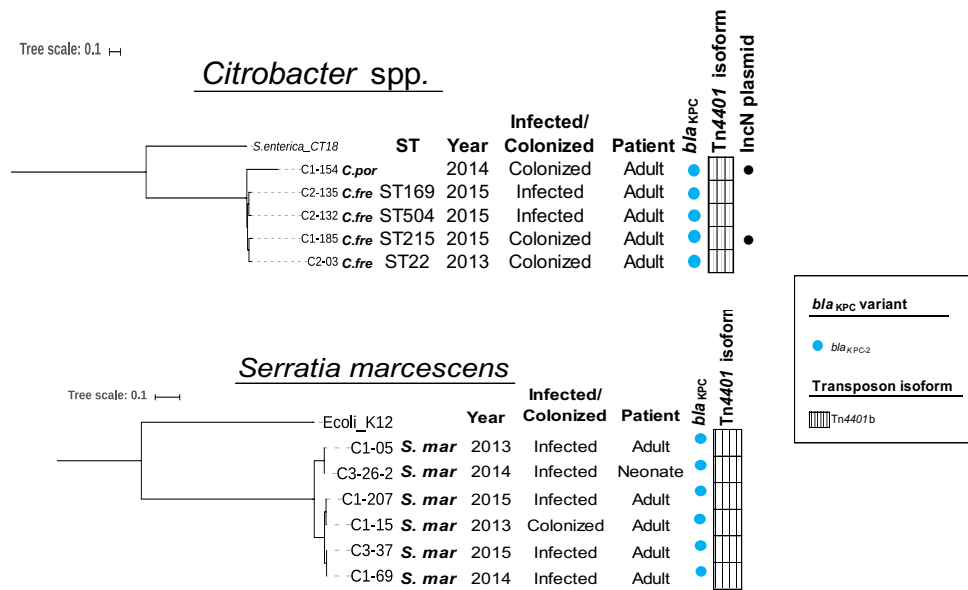


Figure S3 Phylogenetic tree showing the genetic relationships among 5 isolates of genus *Citrobacter* and 6 isolates of *S. marcescens* harboring *bla*_{KPC}, generated by RAxML and visualized by iTOL program. For species assignation “*C. fre*” indicates *Citrobacter freundii*, “*C. por*” indicates *Citrobacter portucalensis* and “*S. mar*” indicates *Serratia marcescens*. Isolates are identified by ST and year of collection. Variants of *bla*_{KPC}, transposable element carrying *bla*_{KPC} and IncN replicon plasmids in the *bla*_{KPC} harboring *Citrobacter* spp. and *S. marcescens* are shown. A dot indicates presence of an IncN plasmid replicon, blank indicates absence.

Anexo A

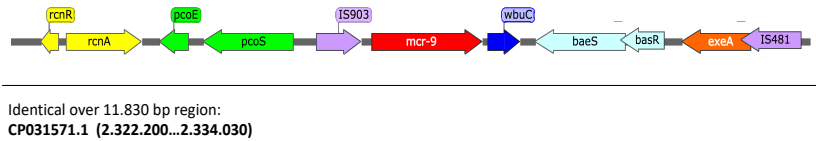


Figure S4 Schematic representation of the genetic environment of *mcr-9* gene identified in *E. kobei* (C1-19) and *E. hormaechei* (C2-37) isolates carrying *bla*_{KPC-2}. The genetic environment is similar to that described for *mcr-9* contained in the chromosome of *E. hormaechei* strain S5 (CP031571.1) [1]. Genes are denoted by horizontal arrows with their corresponding transcription orientations. Gene nomenclature is as follows: transcriptional repressor, *rcnR*; nickel/cobalt efflux system, *rcnA*; copper-binding protein, *pcoE*; sensor histidine kinase, *pcoS*; IS-5 family of transposase, *IS903*; phosphoethanolamine-lipid A transferase, *mcr-9*; cupin fold metalloprotein, *wbuC*; sensor histidine kinase, *baeS*; DNA-binding response regulator, *basR*; ATPase, *exeA*; *IS481*-family of transposase, *IS481*.

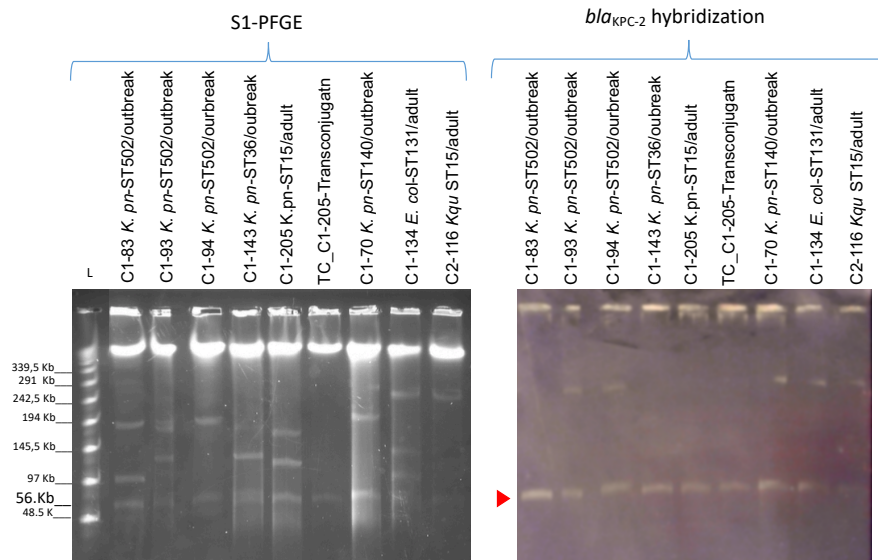


Figure S5 Plasmid location of *bla*_{KPC-2} on *Enterobacteriales* recovered from neonates involved in an outbreak, adults from hospital 1 and 2 and Tc_C1-205 transconjugant confirmed by S1 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (S1-PFGE) and Southern hybridization with a *bla*_{KPC-2} probe. The plasmid band(s) in which the *bla*_{KPC-2} was detectable was marked by a red triangle.

Anexo A

Table S1 Demographic and clinical characteristics of adults infected or colonized by KPC-producing *Enterobacteriales*

Variable	Overall (n=58) n(%)	Colonized (n=27) n(%)	Infected (n=31) n(%)	p-value
Age, median (IQR)		61(48-79)	70 (56-81)	0.20
Gender				
Male	33(56.9)	12 (44.4)	21(67.7)	0.13
Condition of colonized patient				
Colonization with 2 different KPC-PE	2(3.4)	2(7.4)	–	–
Days of hospital stay before sampling, median (IQR)		5(1-11)	15(3-28)	0.003
History in past 6 month				
Hospitalization	45(77.6)	21(77.7)	24(77.4)	1.0
Stay in ICU	9(15.5)	4(14.8)	5(16.1)	1.0
Dialysis	7(12.1)	1(3.7)	6(19.4)	0.11
Hospital location				
AICU	5(8.6)	3(11.1)	2(6.5)	0.66
AITU	14(24.1)	6(22.2)	8(25.8)	0.99
Adult wards	39(67.2)	18(66.6)	21(67.7)	1.0
Medical devices				
Urinary catheter	12(20.7)	4(14.8)	8(25.8)	0.35
Central venous cateter	10(17.2)	4(14.8)	6(19.4)	0.74
Invasive Mechanical Ventilation	7(12.1)	3(11.1)	4(12.9)	1.00
Catheter Ventriculostomy	1(1.7)	1(3.7)	0(0.0)	0.47
Gastric tube	12(20.7)	3(11.1)	9(29.0)	0.12
Isolation sample				
Rectal swab	21(36.2)	21(77.7)	0(0.0)	–
Respiratory sample	13(22.4)	5(18.5)	8(25.8)	–
Urine	11(19)	1(3.7)	10(32.3)	–
Bone	2(3.4)	0(0)	2(6.5)	–
Blood	5(8.6)	0(0)	5(16.1)	–
Secretion and tissue	6(10.3)	0(0)	6(19.4)	–
Comorbidities				
Diabetes	20(34.5)	9(33.3)	11(35.5)	1.00
COPD	12(20.7)	4(14.8)	8(25.8)	0.35
Cancer	4(6.9)	3(11.1)	1(3.2)	0.33
HIV	3(5.2)	3(11.1)	0(0)	0.10
CKD	12(20.7)	3(11.1)	9(29.0)	0.12
Coronary heart disease	5(8.6)	2(7.4)	3(9.7)	1.00
Other heart diseases	6(10.3)	4(14.8)	2(6.5)	0.40
Cerebrovascular disease	4(6.9)	2(7.4)	2(6.5)	1.00
Antibiotic exposure				
Preceding antibiotic exposure	14(24.1)	8(29.6)	6(19.4)	0.55
Aminopenicillin	1(1.7)	1(3.7)	0(0)	0.47
Cephalosporins	8(13.8)	4(14.8)	4(12.9)	1.00
Carbapenems	6(10.3)	3(11.1)	3(9.7)	1.00
Vancomycin	4(6.9)	3(11.1)	1(3.2)	0.33
IB/BL	6(10.3)	4(15)	2(6.5)	0.40
Quinolones	3(5.2)	1(3.7)	2(6.5)	1.00
Macrolide	4(6.9)	4(14.8)	0(0.0)	0.04
anti-GPC	4(6.9)	2(7.4)	2(6.5)	1.00
Other**	1(1.7)	1(3.7)	0(0.0)	0.47

IQR, interquartile range.

AICU, Adult Intensive Care Unit

AITU, Adult Intensive Therapy Unit

COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease

CKD, Chronic kidney disease

IB/BLI, beta-lactam/beta-lactamase inhibitor

Anti-GPC, Anti-Gram positive cocci: daptomycin, clindamycin and linezolid

**Other: aztreonam, rifampicin

Table S2 Demographic and clinical characteristics of neonates colonized by KPC-producing *Enterobacterales* (n=46)

Variable	(n=46) n(%)
Age in days of life at the time of patient isolation, median (IQR) ^a	12 (5-30)
Gender	
Male	28 (60.9)
Number of KPC-E	
Colonization with 1 KPC-E	
Colonization with 2 different KPC-E	7(15.2)
Colonization with 3 different KPC-E	1(2.2)
Days of hospital stay before sampling, median (IQR) ^a	11 (6-27)
Hospital location	
NICU	41(89.1)
Pediatric ward	5(11)
Medical devices	
Central venous cateter	3(7)
Enteral tube	17(37)
Epicutaneous catheter	5(11)
Thoracostomy tube	2(4.3)
Diagnosed at the time of admission	
Preterm birth	12(26.1)
Respiratory distress/Apnea	8(17.4)
Fetal growth restriction	4(8.7)
Bacteremia	3(6.5)
Hydrocephalus	2(4.3)
Low birth weight	2(4.3)
Pneumonia	1(2.2)
Others	14(30.4)
Antibiotic exposure	
No use of antibiotics	29(63.0)
Preceding antibiotic exposure	17(36.9)
Aminoglucozidos	12(26.1)
Aminopenicillin	12(26.1)
Cephalosporins	11(23.9)
Carbapenems	2(4.3)
Vancomycin	2(4.3)
IB/BLI	1(2.2)

^aIQR, interquartile range.

NICU, Neonatal Intensive Care Unit

IB/BLI, betalactam/betalactamase inhibitor

REFERENCES

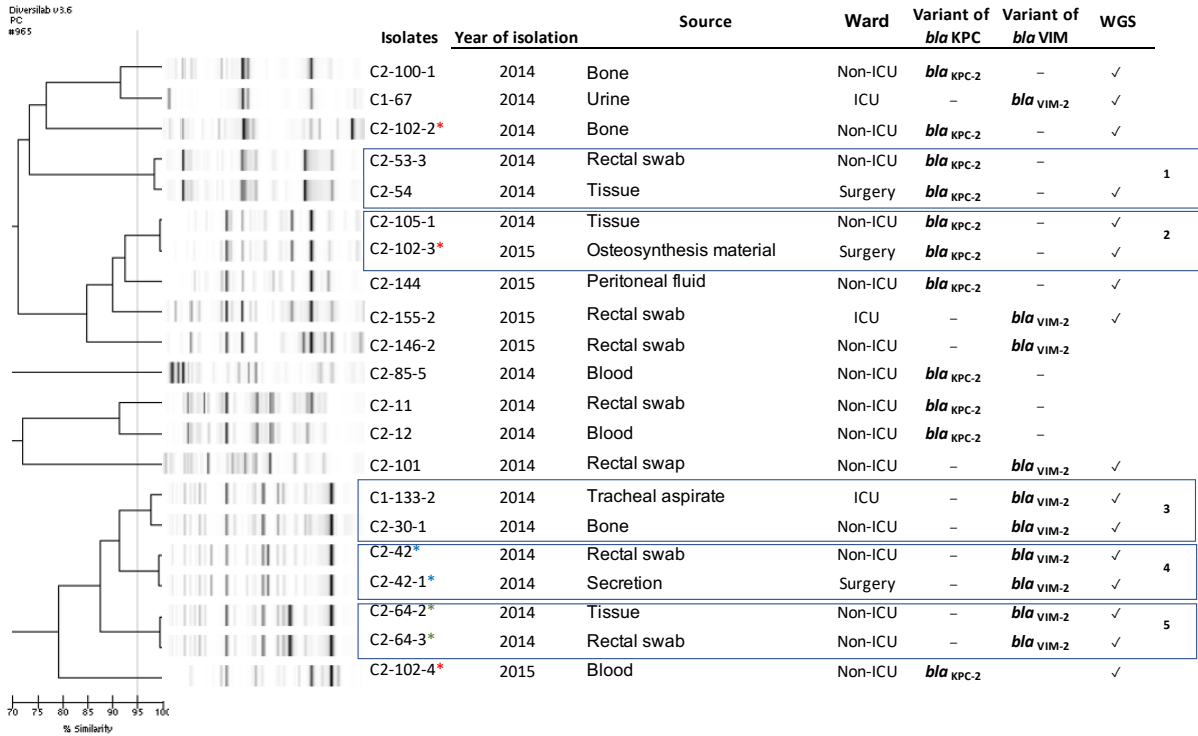
1. Yuan Y, Li Y, Wang G, Li C, Xiang L, She J, Yang Y, Zhong F, Zhang L. 2019. Coproduction Of MCR-9 And NDM-1 By Colistin-Resistant *Enterobacter hormaechei* Isolated From Bloodstream Infection. *Infect Drug Resist* 12:2979–2985.

ANEXO

B

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Rada AM, De La Cadena E, Agudelo C, Pallares C, Villegas MV, Correa A, Restrepo E. Capataz C. Genetic Diversity of Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa Isolates Carrying bla_{VIM-2} and bla_{KPC-2} genes that Spread on Different Genetic Environment in Colombia. Frontiers in Microbiology (Submitted).



* Isolates from the same patient with the same color

Figure S1. Dendrogram depicting genetic relatedness of carbapenemases-producing *P. aeruginosa* isolates by repetitive sequence-based PCR (rep-PCR). We highlight carbapenemases genes *bla*_{KPC-2} or *bla*_{VIM-2} identified in each isolate, and who were selected to whole genome sequencing. Boxes indicate the five rep-PCR types (1-5) found.

Table S1 Demographic and clinical characteristics of patients infected or colonized by Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* n=41

Variable	Overall (n=41) n(%)	Infected (n=24) n(%)	Colonized (n=17) n(%)	p-value
Age, median (IQR)	63 (49-74)	57(44.5-72)	66(54.5-76.5)	0.2
Gender				
Male	28(68.3)	16(66.6)	12 (70.6)	1.0
Days of hospital stay before sampling, median (IQR)	4 (2-24)	13.5(2.5-27.5)	2(1.5-13.5)	0.15
History in past 6 month				
Hospitalization	34(82.9)	17(70.8)	17(100)	0.03
Stay in ICU	10(24.4)	4(16.7)	6(35.3)	0.27
Dialysis	4(9.8)	1(4.2)	3(17.6)	1.0
Hospital location				
AICU	7(17.1)	4(16.7)	3(17.6)	1.0
Adult wards	34(82.9)	20(83.3)	14(82.4)	1.0
Medical devices				
Urinary catheter	8(19.5)	6(25)	2(11.8)	0.43
Central venous cateter	6(14.6)	3(12.5)	3(17.6)	0.68
Invasive Mechanical Ventilation	6(14.6)	4(16.7)	2(11.8)	1.0
Endotracheal tube	1(2.4)	0(0.0)	1(3.7)	0.42
Gastric tube	6(14.6)	5(20.8)	1(3.7)	0.37
Isolation sample				
Rectal swab	12(29.3)	0(0)	12(70.6)	
Soft tissue	7(17.1)	7(29.2)	0(0)	
Respiratory sample ^a	3(4.9)	2(8.3)	1(5.9)	
Urine	5(12.2)	3(12.5)	2(11.8)	
Bone	6(14.6)	4(16.6)	2(11.8)	
Blood	5(12.2)	5(20.8)	0(0)	
Sterile body fluids ^b	4(9.8)	4(16.6)	0(0)	
Comorbidities				
Diabetes	10(24.4)	5(20.8)	5(29.4)	0.71
COPD	4(9.8)	2(8.3)	2(11.8)	1.0
CKD	6(14.6)	3(12.5)	3(17.6)	0.68
Coronary heart disease	6(14.6)	3(12.5)	3(17.6)	0.68
Hypertension	20(48.8)	11(45.8)	9(52.9)	0.76
Antibiotic exposure				
Preceding antibiotic exposure	19(46.3)	10(41.7)	9(52.9)	0.69
Carbapenems	5(12.2)	3(12.5)	2(11.8)	1.0
Fluoroquinolones	4(9.8)	2(8.3)	2(11.8)	1.0
Piperacilin-tazobactam	5(12.2)	3(12.5)	2(11.8)	1.0
Aminoglycoside	4(9.8)	2(8.3)	2(11.8)	1.0
Glycopeptides	5(12.2)	2(8.3)	3(17.6)	1.0

IQR, interquartile range.

AICU, Adult Intensive Care Unit

AITU, Adult Intensive Therapy Unit

COPD, Chronic Obstructive Pulmonary Disease

CKD, Chronic kidney disease

^aRespiratory sample: Sputum, tracheal aspirate and oropharyngeal swab^bSterile body fluids: Pleural fluid and peritoneal fluid

Table 2 Percentages of isolates resistance to antibiotics among carbapenemase-producing and non-carbapenemase-producing *P. aeruginosa* isolates.

Antibiotic	(n=46)	CPPA (n=23)	non-CPPA (n=23)	p-value
	n(%)	n(%)	n(%)	
Piperacillin/Tazobactam (PIP-TZ)	34(73.9)	20(87)	14(60.9)	0.09
Amikacin (AK)	19(41.3)	11(47.8)	8(34.8)	0.55
Gentamicin (GM)	26(56.5)	17(73.9)	9(39.1)	0.04
Cefepime (CEF)	27(58.7)	17(73.9)	10(43.5)	0.07
Ceftazidime (CAZ)	26(56.5)	16(69.6)	11(47.8)	0.23
Imipenem (IMP)	39(84.8)	23(100)	20(86.9)	0.23
Meropenem (MER)	40(87)	22(95.7)	19(82.6)	0.35
Doripenem (DOR)	42(91.3)	23(100)	21(91.3)	0.49
Ciprofloxacin (CIP)	28(60.8)	15(65.2)	13(56.5)	0.76
>3 antimicrobial categories	34(73.9)	20(86.9)	15(65.2)	0.17
AK or GM + CEF + CAZ + IMI + MER + DOR + PIP-TAZO + CIP	15(32.6)	12(52.2)	3(13.0)	0.01

REFERENCIAS

REFERENCIAS

Introducción general

1. Morris S, Cerceo E. Trends, epidemiology, and management of multi-drug resistant Gram-negative bacterial infections in the hospitalized setting. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(4):196. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040196>
2. Mauldin PD, Salgado CD, Hansen IS, Durup DT, Bosso JA. Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(1):109-115. <https://doi.org/10.1128/AAC.01041-09>
3. Kaye KS, Pogue JM. Infections caused by resistant Gram-negative bacteria: epidemiology and management. *pharmacotherapy*. 2015;35(10):949-962. <https://doi.org/10.1002/phar.1636>
4. Souverein D, Euser SM, Herpers BL, Kluytmans J, Rossen JWA, Den Boer JW. Association between rectal colonization with Highly Resistant Gram-negative Rods (HR-GNRs) and subsequent infection with HR-GNRs in clinical patients: A one year historical cohort study. *PLoS One*. 2019;14(1):e0211016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211016>

5. Cantón R, Horcajada JP, Oliver A, Garbajosa PR, Vila J. Inappropriate use of antibiotics in hospitals: the complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31 Suppl 4:3-11. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70126-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70126-5)
6. Kernéis S, Lucet JC. Controlling the Diffusion of Multidrug-Resistant Organisms in Intensive Care Units. *Semin Respir Crit Care Med.* 2019;40(4):558-568. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1696980>
7. Ruppé É, Woerther PL, Barbier F. Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann Intensive Care.* 2015;5(1):61. <https://doi.org/10.1186/s13613-015-0061-0>
8. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules.* 2020;25(6):1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
9. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(10):e01076-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>
10. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci.* 2015;22:90-101. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.08.002>

11. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
12. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and Future of Carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Infections. *Antibiotics (Basel).* 2019;8(3):122 <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030122>
13. García-Betancur JC, Appel TM, Esparza G, Gales AC, Levy-Hara G, Cornistein W, Vega S, Nuñez D, Cuellar L, Bavestrello L, Castañeda-Méndez PF, Villalobos-Vindas JM, Villegas MV. Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2020;117. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1813023>
14. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence.* 2017;8(4):460-469 <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>
15. Mojica MF, Bonomo RA, Fast W. B1-Metallo- β -Lactamases: where do we stand? *Curr Drug Targets.* 2016; 17(9):1029-50. <https://doi.org/10.2174/1389450116666151001105622>

16. Hammoudi Halat D, Ayoub Moubareck C. The current burden of carbapenemases: Review of significant properties and dissemination among Gram-negative bacteria. *Antibiotics* (Basel). 2020;9(4):186. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040186>
17. Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens MJ, Monnet DL, Albiger B, Kohlenberg A; European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network EURGen-Net Capacity Survey Group. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Euro Surveill.* 2019;24(9):1900123. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.9.1900123>
18. Vega S, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among Gram-positive and Gram-negative organisms collected from the Latin American region between 2004 and 2015 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2017;16(1):50. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0222-0>
19. Rojas LJ, Mojica MF, Blanco VM, Correa A, Montealegre MC, De la Cadena E, Maya JJ, Camargo RD, Quinn JP, Villegas MV. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coharboring KPC and VIM carbapenemases in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(2):1101-2. <https://doi.org/10.1128/AAC.01666-12>
20. Villegas M, Lolans K, del Rosario-Olivera M, Suárez CJ, Correa A, Queenan AM, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of metallo-beta-

Referencias-Planteamiento del problema

lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:226-9. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.226-229.2006>

21. Rojas LJ, Weinstock GM, De La Cadena E, Diaz L, Rios R, Hanson BM, Brown JS, Vats P, Phillips DS, Nguyen H, Hujer KM, Correa A, Adams MD, Perez F, Sodergren E, Narechania A, Planet PJ, Villegas MV, Bonomo RA, Arias CA. 2018. An analysis of the epidemic of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: convergence of two evolutionary mechanisms creates the “perfect storm.” J Infect Dis 217:82–92. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix524>.

Planteamiento del problema

1. Nagvekar V, Sawant S, Amey S. Prevalence of multidrug-resistant Gram-negative bacteria cases at admission in a multispeciality hospital. J Glob Antimicrob Resist. 2020;22:457-461. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.030>
2. Frattari A, Savini V, Polilli E, Di Marco G, Lucisano G, Corridoni S, Spina T, Costantini A, Nicolucci A, Fazii P, Viale P, Parruti G. Control of Gram-negative multi-drug resistant microorganisms in an Italian ICU: Rapid decline as a result of a multifaceted intervention, including conservative use of antibiotics. Int J Infect Dis. 2019;84:153-162. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.04.002>

3. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-458. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>.
4. Reyes JA, Melano R, Cárdenas PA, Trueba G. Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American *Enterobacteriales*. *Braz J Infect Dis.* 2020;24(3):231-238. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.03.002>
5. Sheppard AE, Stoesser N, Wilson DJ, Sebra R, Kasarskis A, Anson LW, Giess A, Pankhurst LJ, Vaughan A, Grim CJ, Cox HL, Yeh AJ; Modernising Medical Microbiology (MMM) Informatics Group, Sifri CD, Walker AS, Peto TE, Crook DW, Mathers AJ. Nested Russian Doll-Like Genetic Mobility Drives Rapid Dissemination of the Carbapenem Resistance Gene *bla_{KPC}*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(6):3767-78.

Discusión general

1. Rada AM, Hernández-Gómez C, Restrepo E, Villegas MV. Distribution and molecular characterization of beta-lactamases in Gram-negative bacteria in Colombia, 2001-2016. *Biomedica.* 2019;39(s1):199-220. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>
2. Rojas LJ, Weinstock GM, De La Cadena E, Diaz L, Rios R, Hanson BM, Brown JS, Vats P, Phillips DS, Nguyen H, Hujer KM, Correa A, Adams MD, Perez F, Sodergren E, Narechania A, Planet PJ, Villegas MV, Bonomo RA, Arias CA. An analysis of the

- epidemic of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: convergence of two evolutionary mechanisms creates the “perfect storm.” *J Infect Dis.* 2018;217:82–92. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix524>.
3. Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos AV, Roncancio G, Chavda KD, Kreiswirth BN, Jiménez JN. A two-year surveillance in five Colombian tertiary care hospitals reveals high frequency of non-CG258 clones of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with distinct clinical characteristics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60:332–342. <https://doi.org/10.1128/AAC.01775-15>.
 4. Rinkel M, Hubert J, Roux B, Lett M. Identification of a new transposon Tn5403 in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a polluted aquatic environment. *Curr Microbiol.* 1994;29:249–254. <https://doi.org/10.1007/BF01577436>.
 5. Stoesser N, Sheppard AE, Peirano G, Anson LW, Pankhurst L, Sebra R, Phan HTT, Kasarskis A, Mathers AJ, Peto TEA, Bradford P, Motyl MR, Walker AS, Crook DW, Pitout JD. Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) producing *Escherichia coli*. *Sci Rep.* 2017;7:5917. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06256-2>.
 6. Schweizer C, Bischoff P, Bender J, Kola A, Gastmeier P, Hummel M, Klefisch FR, Schoenrath F, Frühauf A, Pfeifer Y. Plasmid-mediated transmission of KPC-2

- carbapenemase in *Enterobacteriaceae* in critically III patients. *Front Microbiol.* 2019;10:276. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00276>.
7. He S, Chandler M, Varani AM, Hickman AB, Dekker JP, Dyda F. Mechanisms of evolution in high-consequence drug resistance plasmids. *mBio.* 2016;7(6):e01987-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01987-16>
 8. Weingarten RA, Johnson RC, Conlan S, Ramsburg AM, Dekker JP, Lau AF, Khil P, Odom RT, Deming C, Park M, Thomas PJ; NISC Comparative Sequencing Program, Henderson DK, Palmore TN, Segre JA, Frank KM. Genomic analysis of hospital plumbing reveals diverse reservoir of bacterial plasmids conferring carbapenem resistance. *mBio.* 2018; 9(1), e02011-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02011-17>.
 9. Hernández-García M, Pérez-Viso B, Navarro-San Francisco C, Baquero F, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Intestinal co-colonization with different carbapenemase-producing *Enterobacteriales* isolates is not a rare event in an OXA-48 endemic area. *EClinicalMedicine.* 2019;15:72-79. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2019.09.005>
 10. Freitas DY, Araújo S, Folador ARC, Ramos RTJ, Azevedo JSN, Tação M, Silva A, Henriques I, Baraúna RA. Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing Gram-negative bacteria recovered from an Amazonian lake near the city of Belém, Brazil. *Front Microbiol.* 2019; 10:364. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00364>.

11. Kristóf K, Tóth A, Damjanova I, Jánvári L, Konkoly-Thege M, Kocsis B, Koncan R, Cornaglia G, Szego E, Nagy K, Szabó D. Identification of a blaVIM-4 gene in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone and in a *Klebsiella oxytoca* strain in Hungary. J Antimicrob Chemother. 2010;65(6):1303-1305. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq133>
12. Sonnevend Á, Yahfoufi N, Ghazawi A, Jamal W, Rotimi V, Pál T. Contribution of horizontal gene transfer to the emergence of VIM-4 carbapenemase producer Enterobacteriaceae in Kuwait. Infect Drug Resist. 2017 Dec; 10:469-478. <https://doi.org/10.2147/IDR.S149321>.
13. Vanegas JM, Cienfuegos AV, Ocampo AM, López L, del Corral H, Roncancio G, Sierra P, Echeverri-Toro L, Ospina S, Maldonado N, Robledo C, Restrepo A, Jiménez JN. Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia. J Clin Microbiol. 2014;52(11):3978-86. <https://doi.org/10.1128/JCM.01879-14>.
14. Morabito S, Tozzoli R, Caprioli A, Karch H, Carattoli A. Detection and characterization of class 1 integrons in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Microb Drug Resist. 2002;8(2):85-91. <https://doi.org/10.1089/107662902760190626>. PMID: 12118522.
15. Botelho J, Grosso F, Quinteira S, Brilhante M, Ramos H, Peixe L. Two decades of blaVIM-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* dissemination: an interplay between mobile genetic

elements and successful clones. J Antimicrob Chemother. 2018;73(4):873-882.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkx517>. PMID: 29373674.

16. Barraud O, Ploy MC. Diversity of class 1 Integron gene cassette rearrangements selected under antibiotic pressure. J Bacteriol. 2015;197(13):2171-2178. <https://doi.org/10.1128/JB.02455-14>. Epub 2015 Apr 20.

17. Ding B, Shen Z, Hu F, Ye M, Xu X, Guo Q, Wang M. *In vivo* acquisition of carbapenemase gene *bla*_{KPC-2} in multiple species of *Enterobacteriaceae* through horizontal transfer of insertion sequence or plasmid. Front Microbiol. 2016;7:1651. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01651>.

PROCESO FORMATIVO DEL AUTOR

Publicaciones

Artículos publicados

Rada AM, De La Cadena E, Agudelo C, Capataz C, Orozco N, Pallares C, Dinh AQ, Panesso D, Ríos R, Diaz L, Correa A, Hanson BM, Villegas MV, Arias CA, Restrepo E. Dynamics of *bla*_{KPC-2} dissemination from non-CG258 *Klebsiella pneumoniae* to other *Enterobacteriales* via IncN plasmids in an area of high endemicity. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64:e01743-20.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01743-20>

Rada AM, Hernández-Gómez C, Restrepo E, Villegas MV. Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*. 2019;39(Supl.1):199-220.

<https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>

Artículos sometidos

Rada AM, Correa A, Restrepo E, Capataz C. *Escherichia coli* ST471 Producing VIM-4 Metallo- β -lactamase in Colombia. *Microbial Drug Resistance* (Submitted).

Rada AM, De La Cadena E, Agudelo C, Pallares C, Restrepo E, Correa A, Villegas MV, Capataz C. Genetic diversity of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Carrying *bla*_{VIM-2} and *bla*_{KPC-2} genes that Spread on Different Genetic Environment in Colombia. *Frontiers in Microbiology* (Submitted).

Presentación de resultados en eventos académicos

Rada AM. Multispecies outbreak in via promiscuous plasmid. XII International Symposium on Bacteria Resistance, Diagnostic Stewardship and Infection Control. 2021. Universidad El Bosque. Colombia.

Rada AM, De la Cadena E, Orozco N, Agudelo C, Capataz C, Perenguez M, Hernández-Gómez C, Pallares C, Porras P, Ardila J, Ríos R, Reyes J, Diaz L, Correa A, Villegas MV, Arias C, Restrepo E. Plasmid Promiscuity Explains High Endemicity of KPC-2 Among Colombian *Enterobacteriaceae*. *Open Forum Infect Dis*. 2017;4(Suppl 1):S602–3.
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofx163.1581>

Rada AM, Orozco N, Agudelo C, Capataz C, De la Cadena E, Perenguez M, Hernandez-Gómez C, Pallares C, Porras P, Ardila J, Ríos R, Reyes J, Diaz L, Correa A, Villegas MV, Arias C, Restrepo E. Characterization of Carbapenemase-producing Gram-negative Bacilli Clinical Isolates in Antioquia, Colombia Using Whole Genome Sequencing (WGS). *Antibiotic Resistance Symposium: Novel Frontiers in Antimicrobial Research* . 2017. UT

Center for Antimicrobial Resistance and Microbial Genomics (CARMiG). Gulf Coast Consortium - Antimicrobial Resistance Cluster

Rada AM, Orozco N, Agudelo C, Capataz C, Hernandez-Gómez C, Pallares C, De la Cadena E, Perenguez MN, Correa A, Arias C, Villegas MV, Restrepo E. Molecular Characterization of Carbapenemase-Producing Gram-negative Bacilli from Three Hospitals in Antioquia, Colombia. *Open Forum Infectious Diseases*. 2016 Volume 3, Issue suppl_1, 204.

<https://doi.org/10.1093/ofid/ofw172.71>

Sylva D, González MR, Arango AM, Villegas E, Ramírez E, Uribe AF, Pérez A, Restrepo CA, Agudelo CA, Rada AM, Restrepo E. Control of an outbreak of colonization and infection by carbapenemase resistant Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit in Medellín-Colombia. 9th World Congress on Pediatric Infectious Diseases (WSPID 2015). Rio De Janeiro Brazil.

Agudelo CA, Zuluaga M, Villa P, Molina F, Rada AM, Restrepo E, Hidrón A. Performance of ChromoID ESBL Chromogenic Agar Media for Screening for Colonization with Carbapeneme-Resistant Enterobacteriaceae in Neonates. International Congress of Chemotherapy (ICC) as a joint meeting in 2015. San Diego-California U.S.

Seminarios Ciencias Básicas Biomédicas modalidad poster y oral.

VII Seminario Ciencias Básicas Biomédicas. 2016. Universidad de Antioquia. 2016. Colombia.

VI Seminario Ciencias Básicas Biomédicas. 2015. Universidad de Antioquia. 2015. Colombia.

Título: Caracterización Molecular de Bacilos Gram Negativos Productores de Betalactamasas Provenientes de Centros Hospitalarios de Tres Municipios de Antioquia Entre los Años 2013-2015.