



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina
Eje de Microbiología

Determinación de genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos y análisis de entornos genéticos en cepas de *Klebsiella sp.*

Tesis para obtener el grado de:
Licenciado en Biomedicina.

Presenta:
Diana Flores Percino.

Directora de tesis:
D.C. Patricia Lozano Zarain.

Co-asesor:
D.C. María Elena Bello López.

Directora Metodológica:
D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia.

Puebla, Pue., febrero, 2022.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad** del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por permitirme realizar este trabajo bajo la dirección de la **D.C. Patricia Lozano Zarain**.

A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado**, por los apoyos de financiamiento otorgados para el proyecto: 100031833-VIEP2021. Estudio de la virulencia y resistencia a los antibióticos, caracterización parcial de plásmidos y microvesículas en cepas de *Klebsiella* spp. clásicas e hipermucoides aisladas de diferentes hospitales mexicanos y la comunidad.

A los colaboradores y Hospitales que donaron cepas bacterianas estudiadas en este trabajo de tesis: **M. C. Zita Gutiérrez Cazares (Hospital para el Niño Poblano), QFB. Guadalupe Jiménez Flores (H. R. I.S.S.S.T.E. Puebla), Dr. César Raúl González Bonilla (H. G. R. No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla)** y a los integrantes del área de Bacteriología del **Hospital de especialidades I.S.S.S.T.E.P. “5 de Mayo”**.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.

A mis padres **Josefina y Roberto**, por apoyarme en esta desición a pesar de no ser lo que ellos querían. A mi mamá especialmente por sus consejos y el soporte que me brindo, aunque haya sido a su manera, y sobre todo porque es la que más me sigue dando ánimos para seguir mi camino en la ciencia. Mi papá, que siempre ha soportado todo lo malo que he hecho, y que a pesar de que siempre peleamos nunca ha dejado de estar ahí como un gran soporte.

A mi hermano **Roberto**, por soportarme siempre que estoy de malas, en especial cuando estaba estresada, y más que nada, por siempre estarme preguntando sobre temas de la carrera, lo que me hacía sentir que de verdad estaba aprendiendo algo, emocionándome porque podía compartir ese conocimiento.

A **Pato (Patricia)**, que siempre me escuchaba cuando hablaba de las cosas que me emocionaban sobre lo que estudiábamos en el eje de Microbiología, que a pesar de que era molesto, nunca se quejó y siempre me apoyó para seguir haciendo lo que me gustaba. Gracias por todos los años de amistad.

A **Mari**, por siempre estar ahí para mí animándome e impulsándome a seguir cada que sentía que estaba haciendo todo mal, siempre estando en las buenas y en las malas. Te debo mucho, y agradezco que sigas siendo mi amiga a pesar de tantos años de conocernos.

A **Mitchell**, por ser un excelente amigo con el que siempre pude desahogarme, que también me permitía compartirle todo lo que me emocionaba en la carrera y que aguantaba cada que me quejaba de ciertas materias.

A **Juls**, por siempre estar ahí cuando necesitaba desahogarme de cosas que no le quería compartir a nadie más, con la que siempre he podido hablar de todo y por siempre apoyarme en cualquier desición que tomo, animándome e impulsándome a seguir en la ciencia. Y también a su familia, que siempre confía en mí, sobre todo su abuela que está al pendiente de lo que me pasa y que me desea lo mejor.

A **David Eduardo (Güero)**, que me aguantó durante toda la carrera, lo obligué a ser mi primer amigo en ese nuevo ambiente, y en verdad le agradezco su amistad y

todos los proyectos en los que trabajamos juntos, así no muriendo en el intento. Me escuchaba a pesar de que no quería y fue divertido apostar para ver quién avanzaba más rápido en su respectiva tesis. Creo que perdí.

A **Brenda** por ser mi hermanita de Laboratorio. Gracias por ayudarme cuando tenía alguna duda y por apoyarme cada que lo necesité, por los momentos divertidos, las salidas y todo lo que pasamos juntas estos 5 años. Espero que sigamos compartiendo buenos momentos durante muchísimo tiempo más.

A mis compañeros **David Gaona** y **Araceli** por ser buenos amigos durante estos años, y que me ayudaron a soportar todo el eje básico.

A la **D.C. Paty**, que me guió en todo este proceso. Por aceptarme para ser parte del laboratorio, donde aprendí muchísimo, donde me enamoré de la microbiología y donde conocí gente maravillosa. Como **Pato (Ricardo)**, que siempre estuvo dispuesto a enseñarme a pesar de que Güero y yo éramos un desastre durante las rotaciones. A **Marco** por enseñarme todo lo de *Klebsiella*. Tuve la oportunidad de conocer a **Michelle, Miranda, Mariela, Cristi, Deysi, Edwin, Ceci, Brenda, Lorena** y **Midory**. A **Jessi**, que me enseñó mucho durante la pandemia sobre herramientas bioinformáticas y me ayudaba cada que lo necesité. A **Elenita**, con quien pude acercarme siempre que tenía una duda, que me explicó muchas cosas y que siempre estaba dispuesta a ayudarnos en todo, y que me apoyó en todo el proceso de la tesis como co-asesora.

A la **D.C. Rosy** y al **D.C. Miguel**, por el apoyo brindado en este camino, la ayuda para plantear algunos objetivos y la guía en todas las correcciones hechas.

A los **Microbichitos** por el apoyo brindado, los desayunos mensuales y por todos los momentos que pasamos juntos, hicieron memorables los últimos dos años de carrera, aunque hayan sido virtuales.

A todos los **docentes del Eje de Microbiología**, sinceramente hicieron los últimos semestres los mejores y más interesantes de la licenciatura.

*"Investigación es lo que hago cuando no sé lo que estoy
haciendo".*

-Wernher von Braun

*"No son las habilidades lo que demuestra lo que somos, son
nuestras decisiones"*

— J.K. Rowling, Harry Potter y la cámara de los secretos.

INDICE.

1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1. Resistencia a los antibióticos.....	10
2.2. Infecciones Asociadas a la atención de la Salud.	13
3. ANTECEDENTES.....	14
3.1. Antecedentes generales	14
3.1.1 El género <i>Klebsiella</i>	14
3.1.2 Generalidades de <i>K. pneumoniae</i>	15
3.1.3 Factores de virulencia de <i>K. pneumoniae</i>	17
3.1.4 Generalidades de <i>Klebsiella oxytoca</i>	19
3.1.5 Infecciones por <i>Klebsiella</i> spp.....	19
3.1.6 Resistencia a antibióticos reportada en <i>Klebsiella</i> sp	20
3.1.7 Tratamiento con fluoroquinolonas y aminoglucósidos para infecciones causadas por <i>Klebsiella</i> sp	21
3.1.8 Resistencia a quinolonas por <i>Klebsiella</i> sp.....	22
3.1.9 Resistencia a aminoglucósidos por <i>Klebsiella</i> sp.....	23
3.1.10 Transferencia horizontal de genes y la resistencia a antibióticos	24
3.2. Antecedentes específicos.....	25
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
5. HIPÓTESIS CIENTÍFICA	28
6. OBJETIVOS	28
6.1. Objetivo General.....	28
6.2. Objetivos Particulares.....	28
7. MATERIALES Y MÉTODOS	29
8. RESULTADOS	33
8.1. Identificación de los genes de resistencia a aminoglucósidos en cepas de <i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	33
8.2. Identificación de los genes de resistencia a quinolonas en cepas de <i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	35

8.3. Identificación de los genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de <i>K. oxytoca</i>	37
8.4. Análisis bioinformático de cepas de <i>K. pneumoniae</i> resistentes a quinolonas y aminoglucósidos.....	38
8.4.1. Análisis de los entornos genéticos de <i>qnrB</i>	40
8.4.2. Análisis de los entornos genéticos de <i>aac(6')-Ib-cr</i> y <i>aac(6')-Ib</i> ...	43
8.4.3. Análisis de los entornos genéticos de <i>aac(3)-II</i>	46
8.4.2. Plásmidos portadores de genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos.	47
8.7. Búsqueda de posibles promotores de los genes <i>qnrB</i>	50
9. DISCUSIÓN	54
10. CONCLUSIONES	65
11. PERSPECTIVAS.	66
12. BIBLIOGRAFÍA	67
13. ANEXOS	77

Índice de figuras.

# Figura	Título	Página
1	Factores de Virulencia.	17
2	Detección del gen <i>aac(6')-Ib</i> .	34
3	Detección del gen <i>aac(3)-II</i>	34
4	Número de cepas de <i>K. pneumoniae</i> positivas a los genes de resistencia a aminoglucósidos de interés.	35
5	Detección del gen <i>qnrB</i> .	36
6	Porcentajes de cepas positivas a los genes de interés.	37
7	Entorno del gen <i>qnrB4</i> .	40
8	Entorno del genes <i>qnrB2</i> .	41
9	Entorno del gen <i>qnrB1</i> .	42
10	Alineamiento de secuencias de nucleótidos.	44
11	Alineamiento de secuencias de aminoácidos.	45
12	Entorno de los genes <i>aac(6')-Ib-cr</i> .	45
13	Entorno de los genes <i>aac(3)-II</i> .	46
14	Entorno de los genes <i>aac(6')-Ib</i> .	46
15	Posibles promotores para <i>qnrB4</i> .	51
16	Posibles promotores para <i>qnrB2</i> .	52
17	Posibles promotores para <i>qnrB1</i> .	53

Índice de tablas.

# Tabla	Título	Página
1	Oligonucleótidos y condiciones a utilizar en la amplificación de los genes de interés.	30
2	Cepas control utilizadas para la amplificación de los genes de interés.	31
3	Posición de los genes de interés en los nodos de los ensamblados.	39
4	Plásmidos reportados en <i>K. pneumoniae</i> con determinantes de RQMP <i>qnrB</i> .	49

Abreviaturas.

AIE	Agua Inyectable Estéril.
AN	Amikacina.
BET	Bromuro de Etidio.
CIP	Ciprofloxacino.
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria.
EMA	Enzima(s) Modificadora(s) de Aminoglucósidos.
ENA	European Nucleotide Archive.
GM	Gentamicina.
GER	Grado de Expresión Relativa.
GLASS	Sistema de Vigilancia de Uso y Resistencia Global a los Antimicrobianos.
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud.
IC1C	Integrón Clase 1 Complejo.
IS	Secuencia de Inserción.
ITU	Infección de Tracto Urinario.
LVX	Levofloxacino.
MDR	Multidrogo-resistente.
NA	Ácido Nalidíxico.
NOR	Norfloxacino.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ONU	Organización de las Naciones Unidas.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica.
RQMP	Resistencia a Quinolonas Mediada por Plásmidos.
SSE	Solución Salina Ésteril.
NN	Tobramicina.
TSA	Agar Soya-Trypticaseína.
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos.
µg	Microgramos.
µl	Microlitros.

1.- RESUMEN.

K. pneumoniae pertenece al grupo bacteriano *ESKAPE*, portando resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos, carbapenémicos y fluoroquinolonas. *K. pneumoniae* ha adquirido mecanismos de resistencia a aminoglucósidos mediada por plásmidos, como enzimas modificadoras de aminoglucósidos, o genes de la familia *armA*, que metilan la región 16SrRNA y los determinantes de resistencia a quinolonas como los *qnr* y *aac(6')-Ib-cr*.

En este estudio se determinó la presencia de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas, así como los entornos genéticos de los genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-II* y *aac(6')-Ib* en cepas de *Klebsiella sp.* Se amplificó por PCR el genotipo de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en 65 cepas provenientes de instituciones de Salud Pública en México, identificando los genes mediados por plásmidos: *aac(6')-Ib*, *aac(3)-II*, *qnrB* y *qnrA*. Se analizaron *in silico* los plásmidos y entornos genéticos que rodean a los genes *aac(6')-Ib*, *aac(3)-II*, y los determinantes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos: *qnrB* y *aac(6')-Ib-cr*. Para lo cual se utilizaron secuencias obtenidas de la base de datos ENA (SAMN10639440, SAMN10639726, SAMN10639736 y SAMN10639737); del NCBI (EF219134, MT560062) y otras 2 secuencias de *K. pneumoniae* con determinantes de resistencia a quinolonas, adicionalmente se analizaron los probables promotores de los genes *qnrB*. Las secuencias de los plásmidos fueron seleccionadas por contar con su secuencia completa y circularizada.

El 80.95% (51/63) de las cepas resistentes a aminoglucósidos fueron positivas a la presencia de *aac(6')-Ib*. En el caso del gen *aac(3)-II*, el 74. 6% (47/63 cepas) fueron positivas. En el 90.9% (50/55 cepas) se encontró el gen *qnrB*.

En los análisis *in silico* de las secuencias de los genomas de Kpn33, Kpn125, CM155 y pJIE137, los genes *qnrB4* y *qnrB2*, fueron encontrados en Integrones Clase 1 Complejos, mientras que en Kpn47 y pRIVM_C014906_2 el gen *qnrB1* estaba rodeado de IS y transposones. En los análisis de *aac(6')-Ib*, *aac(3)-II* y *aac(6')-Ib-cr* también se observan entornos con IS y Tn. En los entornos se encontraron otros genes de resistencia a aminoglucósidos, betalactámicos, trimetoprim o tetraciclina. En el análisis de plásmidos observamos que los genes *qnrB* se detectaron en plásmidos de grupos de incompatibilidad diversos, como IncR, IncC, IncL/M, IncHI1B-like o IncF, siendo este último el reportado con mayor frecuencia. En su mayoría se trata de plásmidos con un tamaño >100000 pb, aunque la variante *qnrB19* se ha aislado de un plásmido de sólo 2750 pb. Al determinar los posibles promotores de los genes *qnrB4*, *qnrB2* y *qnrB1*, encontramos que en el caso de *qnrB4* no se logró identificar un promotor cercano al gen, pero se observó una prevalencia del gen *pspF* codificado en el mismo sentido y posicionado a escasa distancia, por lo que el promotor de este gen podría estar influyendo en la expresión de *qnrB4*. Para *qnrB1* y *qnrB2* se encontraron los posibles promotores junto al regulador transcripcional LexA. En este estudio se mostró la presencia de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a aminoglucósidos y/o quinolonas portando los genes *aac(6')-Ib*, *aac(3)-II* y *qnr*. El análisis mostró la participación de transposones, secuencias de inserción e integrones Clase 1 Complejos en la diseminación de estos genes. Se encontraron los posibles promotores de genes *qnr*, intuyendo la posible influencia del promotor de *pspF* en la expresión de *qnrB4*.

Palabras Clave: *Klebsiella pneumoniae*, genes de resistencia a quinolonas, aminoglucósidos.

2.- INTRODUCCIÓN

Resistencia a los antibióticos.

El desarrollo de una gran diversidad de moléculas con actividad antimicrobiana inició desde el descubrimiento de la penicilina en 1928, por Alexander Fleming (Vanegas-Múnera y Jiménez-Quiceno, 2020). No obstante, tan solo tres años después de la comercialización de la Penicilina G, se describieron los primeros casos fallidos de tratamientos utilizando este fármaco (Fariña, 2016).

La resistencia a antimicrobianos es un problema relevante de salud pública, reconocido por agencias independientes, gobiernos y organizaciones mundiales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas (ONU) (Gil-Gil *et al.*, 2019). El fenómeno de resistencia a los antibióticos naturalmente es un proceso evolutivo en los microorganismos; sin embargo, este proceso se ha acelerado a través de la presión selectiva que provoca el uso desmedido de estos agentes, así como la mala praxis para mantener la salud humana o animal (OMS, 2021). También, hay que considerar la importancia que tienen factores que promueven la diseminación de bacterias que poseen genes de resistencia, como programas de control de infecciones insuficientes, contaminación ambiental o movilización geográfica de personas o animales infectados (McEwen y Collignon, 2018).

En los últimos 70 años, la presión selectiva ha contribuido a la diversificación de los genes que codifican para factores de resistencia, hecho que se puede observar en el número actual de variantes de la β -lactamasa *bla*_{TEM}, que antes de la introducción en la clínica de las cefalosporinas de tercera generación, sólo reportaba 2 variantes (TEM-1 y TEM-2), pero en años recientes, el número de dichas variantes ascendió a más de 187 (Alós, 2014).

Algunos de los mecanismos de resistencia que poseen las bacterias son: bombas de eflujo para la expulsión de los antibióticos que entran a la célula, degradación enzimática de las moléculas antibióticas, nuevas vías metabólicas, modificación de los blancos farmacológicos o cambios en la permeabilidad de la membrana (Ferri *et*

al., 2017). La resistencia a antibióticos en las bacterias puede categorizarse como intrínseca, al ser un proceso natural que ocurre independientemente de la exposición del microorganismo a los antibióticos y en el que se pueden encontrar los determinantes de este fenómeno dentro del genoma de un grupo o especie bacteriano, (siendo típicamente mediado por cromosoma); o extrínseca, por la transferencia de material genético con determinantes de resistencia, siendo este el tipo que más preocupación clínica causa al propiciar la conversión a cepas resistentes a aquellas que anteriormente eran susceptibles (Morrison y Zembower, 2020). Determinantes de resistencia pueden ser transferidos de una bacteria a otra por medio de mecanismos de transferencia horizontal, como transformación, conjugación por medio de plásmidos, que pueden ser diseminados rápidamente entre las comunidades bacterianas, o por medio de transducción, proceso involucrado en la diseminación de bacteriófagos. No podemos olvidar la participación de los elementos genéticos móviles o movilizables (EGM) como plásmidos, islas genómicas, secuencias de inserción, transposones, integrones o elementos minúsculos transponibles de repetición invertida (MITE, por sus siglas en inglés) (Ferri *et al.*, 2017; Morrison y Zembower, 2020).

Los plásmidos que portan genes de resistencia o virulencia, ofrecen una ventaja a su portador, siendo capaces de evolucionar en el genoma de las bacterias como una parte integral (Carattoli, 2013). Los plásmidos juegan un papel importante en la evolución de la resistencia a antibióticos bacteriana, diseminando genes de resistencia entre los patógenos de mayor preocupación clínica. Los plásmidos **conjugativos**, son los vehículos de mayor relevancia en la propagación de determinantes de resistencia a antibióticos en bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* o a la familia *Enterococcaceae* (San Millan, 2018).

La resistencia a los antimicrobianos ha sido reportada en todas las partes del mundo (OMS,2015). Tan solo en Estados Unidos de América (EUA), alrededor de 2.8 millones de personas anualmente, adquieren infecciones causadas por agentes drogo-resistentes, resultando en aproximadamente 35,000 muertes (Morrison y Zembower, 2020). El Sistema de Vigilancia de Uso y Resistencia Global a los

Antimicrobianos (GLASS, por sus siglas en inglés) reporta que la resistencia a antimicrobianos es un problema en aumento, especialmente en países con bajos o medianos ingresos, impactando significativamente en los niveles de morbilidad y mortalidad (OMS,2021). Si no se controla el problema que representa la resistencia a los antibióticos, se prevé que para el año 2050, alcanzaremos una etapa denominada por la OMS como “era postantibiótica”, en la que, a pesar de contar con los más de 200 antibióticos desarrollados hasta el momento, ninguno supondrá una opción terapéutica efectiva, ocasionando más de 10 millones de muertes alrededor del mundo, un valor de mortandad incluso mayor que el que representan las enfermedades crónicas y el cáncer (Vanegas-Múnera y Jiménez-Quiceno, 2020).

En 2015, la OMS informó a través del análisis que realizó para determinar la situación de respuesta en los países del mundo hacia la problemática de la resistencia a antibióticos, que en la región de las Américas (conformada por 35 naciones, de las que la mayoría se encuentran en vías de desarrollo), solo 26 países contaron con información recabada sobre su situación ante esta problemática, y de estos, apenas tres reportaron tener un plan de acción nacional (OMS,2015). En este mismo año, se estableció un plan de acción mundial para combatir la resistencia a antibióticos durante la Asamblea Mundial de la Salud, con la intención de que se implementaran 5 objetivos estratégicos: 1) mejorar la concienciación y la comprensión con respecto a la resistencia a los antimicrobianos; 2) reforzar los conocimientos a través de la vigilancia y la investigación; 3) reducir la incidencia de las infecciones; 4) utilizar de forma óptima los agentes antimicrobianos; y 5) asegurar una inversión sostenible para combatir la resistencia a los antimicrobianos (OMS, 2016).

La OMS catalogó un grupo de patógenos de importancia clínica a los que se les debe dar prioridad para el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana. En las categorías encontramos patógenos de **prioridad crítica** (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacterias*), **prioridad alta** (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Camylobacter* sp.,

Helicobacter pylori, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella* sp.) y **prioridad media** (*Streptococcus pneumoniae*, *Shigella* sp., *Haemophilus influenzae*) (OMS,2020). Por esto, el estudio de los determinantes de resistencia presentes en los diferentes grupos bacterianos es de suma importancia, para encontrar un enfoque eficaz y eficiente contra esta problemática.

Infecciones Asociadas a la atención de la salud.

Una Infección Asociada a la Atención de la Salud (IAAS) se define como “una infección cursada por un paciente durante el proceso de cuidado en un hospital u otro centro de atención de salud que no se encontraba presente o incubándose al momento de la admisión. Esto incluye infecciones adquiridas en el hospital que aparecen después del alta y también las infecciones ocupacionales entre el personal de la institución”. Este término actualmente reemplaza a los conceptos de infecciones “nosocomiales” u “hospitalarias” (OMS, 2011). Las IAAS son el resultado de secuencias de interacciones y condiciones especiales que permiten que un agente infeccioso ingrese y afecte a un hospedero susceptible (OMS y OPS, 2017).

Las IAAS actualmente representan un problema de salud pública mundial, y tienen un gran impacto social y económico, pues se ha observado que prolongan las estancias hospitalarias entre 5.9 - 9.6 días, aumentando la probabilidad de muerte en los pacientes hasta un 6.9% (Rodríguez-Salgado, 2018). Se considera que las IAAS son más frecuentemente adquiridas en pacientes con enfermedad crítica admitidos en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), y se estima que, por cada 100 pacientes, 7 contraen este tipo de infecciones en países desarrollados, mientras que en países en vías de desarrollo el número asciende a entre 10 – 15 (OMS, 2011).

En México, se calcula que, de cada 100 mil habitantes en el país, 32 muertes son causadas por IAAS, teniendo un promedio de 450 mil casos. De igual forma, la prevalencia de estas infecciones alcanza el 21% de los casos de hospitalización, o más de 23% cuando se trata de pacientes en la UCI; cifras que duplican o triplican los estándares internacionales (Rodríguez-Salgado, 2018).

Más del 16% de las IAAS son causadas por microorganismos multidrogoresistentes. La prevalencia de las Enterobacterias resistentes a carbapenémicos aumentó entre 3.5 y 4.2% en contraste con aquellas susceptibles, disminuyendo la cantidad de tratamientos efectivos disponibles, contribuyendo al aumento de las tasas de mortalidad y morbilidad. Se ha observado que en los pacientes con infecciones por *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, las probabilidades de muerte es 4.5 veces más que aquellos con infecciones de cepas susceptibles (Hsu, 2014).

3.ANTECEDENTES.

Antecedentes generales.

El género *Klebsiella*.

El género *Klebsiella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está conformado por bacterias en forma de bacilos, no móviles, encapsuladas, Gram-negativas, y anaerobias facultativas. Son ubicuas de la naturaleza, encontrándose desde el suelo, a la superficie del agua y en plantas, y también pueden colonizar las superficies de las cavidades de mamíferos como los humanos (Podschun *et al.*, 1998).

A lo largo de los años las especies que conforman el género han variado. Algunas han sido excluidas y otras nuevas han sido integradas. La clasificación actual se ha hecho a través de análisis filogenéticos utilizando técnicas de secuenciación masiva de genomas o filogenias de genes *house keeping*, como el gen *rpoB*. Hasta el momento se han descrito las siguientes especies:

- *Klebsiella pneumoniae*, que posee tres subespecies:
 - *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*
 - *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*
 - *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*

- *Klebsiella oxytoca* (Brisse *et al.*, 2001).
- *Klebsiella michiganensis*
- *Klebsiella africanensis* (Rodrigues *et al.*, 2019)
- *Klebsiella quasipneumoniae*, con 2 subespecies
 - *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*
 - *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Martínez-Romero *et al.*, 2018)
- *Klebsiella variicola*, incluyendo 2 subespecies:
 - *K. variicola* subsp. *tropicalensis*
 - *K. variicola* subsp. *variicola* (Rodrigues *et al.*, 2019; Brisse *et al.*, 2014).

Todas las bacterias pertenecientes a este género son consideradas patógenos oportunistas asociadas principalmente a infecciones adquiridas en hospitales, como son la sepsis, neumonía o las infecciones de tracto urinario (Brisse *et al.*, 2001). Sin embargo, es *K. pneumoniae* la especie mayormente aislada causando infecciones en humanos y otros hospederos; aunque, actualmente, *K. oxytoca*, también está siendo aislada con alta frecuencia causando infecciones en humanos (Merla *et al.*; 2019).

Generalidades de *K. pneumoniae*.

Esta bacteria, en humanos, se puede hallar como saprófito en la nasofaringe y es causante de enfermedades como neumonía, infecciones sanguíneas, meningitis, absceso piogénico hepático e infecciones de tracto urinario, siendo este el lugar más común de infección. En medio a base de agar presenta un fenotipo mucoso debido a su cápsula de polisacárido, es fermentadora de lactosa y utiliza la urea como fuente de nitrógeno dentro de su hospedero (Martin *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2014; Podschun *et al.*, 1998).

Actualmente se han descrito dos tipos de *K. pneumoniae*: hipervirulenta y clásica (Figura 1). La *K. pneumoniae* hipervirulenta se considera un problema de salud emergente, es transportada en el tracto gastrointestinal de las personas lo que

permite su fácil diseminación, y se ha asociado a infecciones adquiridas por la comunidad aún en pacientes aparentemente saludables. Fue descrita por primera vez en Taiwán, es causante de absceso hepático piogénico y se caracteriza por desarrollar metástasis a sitios distales del primer lugar de infección, como el sistema nervioso y los ojos (Catalán-Nájera *et al.*, 2017; Choby *et al.*, 2019).

Las variantes hipervirulentas de la bacteria pueden presentar un fenotipo de hipermucosidad, que a comparación con el fenotipo mucoide natural de *K. pneumoniae*, en medios enriquecidos presentan una “prueba de cuerda” positiva. Esta prueba se basa en cultivar a la bacteria en un medio rico (agar sangre), posteriormente, al extender verticalmente una colonia haciendo un bucle, si muestra un hilo con una longitud ≥ 5 mm se considera como positiva al fenotipo de hipermucosidad. Existen casos de cepas hipervirulentas sin fenotipo de hipermucosidad, por lo que no existe prueba rápida para detección de las variantes, sólo se detectan por análisis de otros factores de virulencia presentes en su genoma (Catalán-Nájera *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017).

Inicialmente las infecciones causadas por las variantes hipervirulentas eran susceptibles a casi todos los antibióticos; excepto ampicilina ya que *K. pneumoniae* tiene resistencia intrínseca a este antibiótico por el gen *bla_{SHV}*, pero recientemente se han reportado casos con cepas multidrogo-resistentes por la diseminación de genes movilizables (Choby *et al.*, 2019).

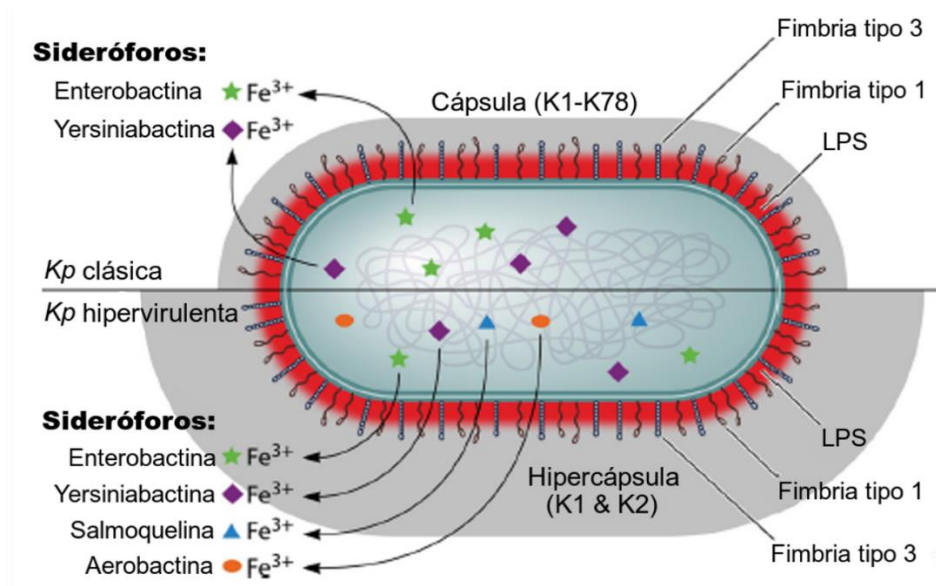


Figura 1. Factores de virulencia. Parte superior: *K. pneumoniae* clásica. Parte inferior: variante hipervirulenta. Imagen modificada de Paczosa y Meccas, 2016.

Factores de virulencia de *K. pneumoniae*.

- Cápsula.

La cápsula está formada de exopolisacáridos y le confiere resistencia a la bacteria contra la fagocitosis por células del sistema inmune del hospedero, evita la acción en la membrana de péptidos antimicrobianos, evita la acción bactericida del complemento, así como la opsonización por anticuerpos inhibiendo la activación de la respuesta inmune innata (Catalán-Nájera *et al.*, 2017; Piperaki *et al.*, 2017).

K. pneumoniae puede ser serotipificada por estructuras presentes en su cápsula como el antígeno-K. Se han clasificado en 78 serotipos siendo K1, K2, K5, K20, K54 y K57 los serotipos más frecuentes y patogénicos. El serotipo K1 es más prevalente en regiones asiáticas mientras que el K2 se encuentra más en América y Europa. (Kaur *et al.*, 2018; Catalán-Nájera *et al.*, 2017; Wick *et al.*, 2018).

- Producción de H_2 .

K. pneumoniae produce H_2 a través de procesos fermentativos para evitar el ataque de especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno

producidos por las células de la respuesta inmune, como los neutrófilos, evitando así el estrés oxidativo y la pérdida de los demás factores de virulencia por la ruptura en la membrana que causan estas moléculas (Kaur *et al.*, 2018).

- Adquisición de hierro.

El hierro es un elemento necesario para el crecimiento y desarrollo de las bacterias, en *K. pneumoniae* se han encontrado distintos mecanismos por los que puede adquirir hierro del ambiente o su hospedero, esto a través de transportadores ABC, el transportador Feo y la secreción de sideróforos para secuestrar y quelar hierro de la hemoglobina o lactoferrina (Martin *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2014; Kaur *et al.*, 2018). La enterobactina es un sideróforo tipo catecolato que es codificado por *K. pneumoniae* desde su genoma *core*; sin embargo, los hospederos desarrollaron un sistema de defensa secretando lipocalina 2, un secuestrador de la enterobactina (Martin *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2014). La bacteria es capaz de secretar otros sideróforos por su genoma accesorio como yersiniabactina, aerobactina o salmoquelina (Lee *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2014).

- Lipopolisacáridos.

Son endotoxinas capaces de proteger a la bacteria contra la respuesta humoral del hospedero. Se clasifican en 12 serotipos mediante el antígeno-O (Kaur *et al.*, 2018).

- Adhesinas.

La presencia de fimbrias tipo 1 y 3, así como KPF-28 y el antígeno no-fimbrial CF-29K, le permiten adherirse a las mucosas del hospedero e incluso le confieren la capacidad de formar biopelículas. La fimbria tipo Kpc se encuentra en cepas con fenotipo hipermucoide y también se ha asociado a la formación de *biofilms* (Kaur *et al.*, 2018; Alcantar-Curiel *et al.*, 2013).

- Plásmido pLVPK e isla de patogenicidad KPHP1208.

El plásmido pLVPK se ha encontrado en cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae*, porta genes que codifican para factores de virulencia como la aerobactina,

salmoquelina y el gen *rpmA*. También, por secuenciación, se ha encontrado la isla de patogenicidad KPHP1208 (208 kb), que contiene genes que codifican para yerseniabactina, colibactina y microcina E492 (Lee *et al.*, 2017).

Generalidades de *Klebsiella oxytoca*.

Anteriormente conocida como *Bacterium oxytoca*, representa la segunda especie más común del género *Klebsiella* causante de enfermedades en humanos. Porta en su cromosoma el gen para la β -lactamasa *bla_{OXY}* que le confiere resistencia a amino y carboxipenicilinas. Se han reportado 8 variantes del gen *bla_{OXY}* y esto ha permitido la clasificación de otras especies del género *Klebsiella* por filogrupos: Kox1, Kox2, Kox3, Kox4, Kox6, Kox7 y Kox8 (Merla *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2016).

Klebsiella oxytoca es considerada parte de la microbiota intestinal, siendo portada por alrededor del 9% de los individuos sanos. Puede ser adquirida en la comunidad, pero recientemente ha ganado significancia al ser aislada de pacientes inmunocomprometidos en las Unidades de Cuidados Intensivos dentro de los hospitales. Los lugares de los que más comúnmente es aislada son en sangre y en secreciones respiratorias. Es un importante patógeno causante de neumonías, pero también se describe su importancia como agente causante de colitis hemorrágica asociada a antimicrobianos por las variantes citotoxigénicas (Cheng *et al.*, 2012).

Infecciones por *Klebsiella* spp.

En Estados Unidos de América, las infecciones causadas por las especies del género *Klebsiella* son la tercera causa más frecuente de infecciones adquiridas dentro de los hospitales, solo detrás de *Clostridium difficile* y *Staphylococcus aureus* (Martin *et al.*, 2018).

Las infecciones más frecuentes causadas por *Klebsiella* spp. en hospitales están asociadas a contaminaciones del equipo médico, desechos con sangre, el tracto gastrointestinal de los pacientes y las manos del personal (Podschun *et al.*, 1998) e incluso se ha demostrado que 5 - 38% de la población es portadora asintomática (Broberg *et al.*, 2014).

La alta tasa de infecciones por *K. pneumoniae* dentro de hospitales representan del 75 al 86% del total de infecciones adquiridas por el género (Broberg *et al.*, 2014).

En México, de acuerdo con el informe anual de 2015 liberado por la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), *K. pneumoniae* se encuentra entre los patógenos más comunes en causar IAAS, ocupando el tercer lugar con un 9.5% de ocurrencia, tan solo después de *E. coli* con 18.8% y *Pseudomonas aeruginosa* con 12.4%. Sin embargo, se encuentra como la segunda causa más frecuente de brotes de IAAS, con un 15.6% de incidencia, sólo detrás de *Acinetobacter baumannii* con un 16.4% (RHOVE, 2016).

De igual forma, en el mismo informe *K. pneumoniae* es reportada como la segunda bacteria más común identificada en las Unidades de Terapia Intensiva Pediátrica y la primera en las Unidades de Terapia Intensiva Neonatal (RHOVE, 2016).

Por su parte, *Klebsiella oxytoca* se colocó como el agente etiológico número 17 causante de IAAS, en México, aislada como agente causal de infecciones como neumonías, bacteriemia, ITU, infección de sitio quirúrgico e infección de tejidos blandos (RHOVE, 2016).

Resistencia a antibióticos reportada en *Klebsiella* spp.

Klebsiella pneumoniae pertenece al grupo *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter spp*) y representa un tercio de las infecciones asociadas al cuidado de la salud causadas por Gram-negativos, portando resistencia a cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos, carbapenémicos y fluoroquinolonas (Kaur *et al.*, 2018). Presenta genes de resistencia en su genoma intrínsecos, es decir, cromosomales, que le confieren resistencia a betalactámicos, por ejemplo, a ampicilina, conocidos como *bla_{SHV}* (Martin *et al.*, 2018; Wyres *et al.*, 2018).

En 2016, se reportó un caso en Nevada, EUA, en el que un paciente murió por un choque séptico causado por una *K. pneumoniae* pandrogo-resistente que no fue susceptible a los 27 antibióticos disponibles (Calfee, 2017). La diseminación global de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a β -lactámicos de amplio espectro y a

carbapenémicos ha hecho que se considere como un problema de salud pública (Wick *et al.*, 2018).

K. oxytoca presenta resistencia a antibióticos por diversos mecanismos. En esta bacteria se ha descrito la producción de β -lactamasas de espectro extendido, AmpC lactamasas, la carbapenemasa KPC y enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA) (Singh *et al.*, 2016).

Tratamiento con fluoroquinolonas o aminoglucósidos para infecciones causadas por *Klebsiella* spp.

Actualmente, el tratamiento de infecciones causadas por Enterobacterias debe basarse en pruebas de sensibilidad a antibióticos *in vitro* y a la experiencia clínica. Para infecciones causadas por *K. pneumoniae* se recomienda como tratamiento la utilización de cefalosporinas y fluoroquinolonas (Murray *et al.*, 2013). Sin embargo, como tratamiento empírico se recomiendan diversas clases de antibióticos específicos para infecciones dependiendo del sitio anatómico.

Se recomienda utilizar fluoroquinolonas para tratar infecciones como ITUs no complicadas, ITUs complicadas y pielonefritis, pneumonias asociadas a la atención de la salud, pacientes en cuidados intensivos (asociado a otros antibióticos como betalactámicos), pneumonias adquiridas en la comunidad, pneumonias adquiridas por ventilador, pneumonias adquiridas en hospitales, infecciones intraabdominales de bajo riesgo, o infecciones de la piel y tejidos blandos (en combinación con una penicilina de amplio espectro o cefalosporina) (Cerceo *et al.*, 2016).

Los aminoglucósidos se recomiendan como tratamiento de ITUs complicadas y pielonefritis, pneumonias adquiridas por ventilador, pneumonias asociadas a la atención de la salud, pneumonias adquiridas en hospitales (estas últimas 3 en asociación con un antipseudomonal si son infecciones crónicas y con riesgo de MDR), o infecciones de sistema sanguíneo asociadas a una línea central (Cerceo *et al.*, 2016).

Resistencia a quinolonas por *Klebsiella* sp.

Las quinolonas son moléculas con efecto bactericida que se derivan del anillo 4-quinolona, fueron reportados por primera vez en 1962 con el descubrimiento del ácido nalidíxico. Se pueden sintetizar de forma no fluorada (primera generación) o fluorada (segunda, tercera y cuarta generación). Su mecanismo de acción es inhibiendo la actividad de la topoisomerasa II (ADN girasa) y/o la topoisomerasa IV, afectando tanto a Gram-negativos como positivos (Velázquez *et al.*, 2008).

Existen 3 mecanismos comunes para que las bacterias desarrollen resistencia a este grupo de antibióticos: mutaciones cromosomales en la ADN girasa (en las subunidades *gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa IV (en las subunidades *parC* y *parE*), sobreexpresión de bombas de eflujo (*qepA*, *OqxA*, *acrAB* y *kdeA*) y plásmidos que contienen genes de resistencia, como son los genes *qnr* (Izadi *et al.*, 2017; Navon-Venezia *et al.*, 2017; Briaes *et al.*, 2012) y el gen *acc-(6')-Ib-cr* que es el único gen descrito hasta ahora que codifica para una proteína que modifica estructuralmente a las quinolonas, primeramente, fue descrito en plásmidos, pero recientemente se han comenzado a encontrar en el cromosoma (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

Genes *qnr*.

Los genes *qnr* codifican para una proteína de 218 aminoácidos de la familia *pentapeptide repeat* que se unen a la topoisomerasa II y la ADN girasa, evitando que las quinolonas tengan efecto. Se han reportado aproximadamente 5 tipos de estos genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*) y cada uno cuenta con variantes alélicas. (Silva-Sanchez *et al.*, 2013). Los genes movilizables *qnrA* y *qnrB* fueron encontrados primeramente en cepas de *K. pneumoniae* y ahora están dispersos entre la familia *Enterobacteriaceae* (Wyres *et al.*, 2018). Estos genes codifican para proteínas que protegen físicamente a los blancos farmacológicos. El primer gen *qnr* fue descrito en un plásmido de *K. pneumoniae* en los EUA en 1998 (Martínez-Martínez *et al.*, 1998).

Por otro lado, la función específica de las proteínas codificadas por genes *qnr*, no ha sido delucidada por completo; sin embargo, se les ha atribuido una función del tipo antitoxina. Esto al observar la posible analogía que tienen con la proteína McbG

(también perteneciente a la familia de pentapéptidos repetidos), cuya función es la de proteger a una célula bacteriana de los efectos de la toxina MccB17 (Strahilevitz *et al.*, 2009).

De acuerdo con un estudio de Izadi *et al.*, en 2017, en cepas aisladas de *K. pneumoniae* la prevalencia de los genes *qnr* es bastante alta, tanto en cepas portadoras de BLEEs, como no portadoras, asociando esto a la presencia de ambos tipos de resistencias en el mismo plásmido, siendo el más común el gen *qnrB*.

Gen *acc-(6')-Ib-cr*

En el año 2005, se reporta la primera y, hasta el momento, única enzima con la capacidad de modificar la estructura del ciprofloxacino, una quinolona con una cadena radical del tipo piperazinil. Esta enzima fue descubierta mientras se estudiaban plásmidos en *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter* sp que portaban el gen *qnrA*. Se determinó que la enzima responsable era una variante de la N-acetiltransferasa (6')-Ib, una enzima modificadora de aminoglucósidos con capacidad de conferir resistencia a amikacina, trobamicina y kanamicina. La variante *aac(6')-Ib-cr* (nombrada así por su capacidad de modificar ciprofloxacino y otorgarle resistencia), presenta dos mutaciones únicas (Trp102Arg y Asp179Tyr) que son las que le confieren la capacidad de modificar a la quinolona (Robicsek *et al.*, 2006).

Resistencia a aminoglucósidos por *Klebsiella* sp.

Los aminoglucósidos son fármacos con efecto bactericida, en su mayoría de origen natural producidos por actinomicetos (*Streptomyces*) o de origen semisintético (amikacina). Reciben ese nombre por su estructura, todos contienen un anillo aminociclitol unido a dos o más azúcares por enlaces glucosídicos. Actúan principalmente contra microorganismos Gram-negativos aerobios, atraviesan la membrana externa de forma pasiva y, a través de mecanismos dependientes de energía, atraviesan la membrana interna inhibiendo la síntesis de proteínas en el ribosoma (Velázquez *et al.*, 2008).

Los aminoglucósidos fueron el tratamiento ideal contra infecciones bacterianas desde mediados de los 1940's hasta 1980, que apareció la resistencia a este grupo principalmente por enzimas del tipo acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfotransferasas, siendo *K. pneumoniae* la primera bacteria en que se describió este tipo de mecanismos (Navon-Venezia *et al.*, 2017; Velázquez *et al.*, 2008). La resistencia puede ser mediada también por la expresión de bombas de eflujo (AcrAB-TolC y KpnEF) o por la pérdida de porinas (como KpnO); dicha pérdida genera un cambio en la permeabilidad de la membrana de la célula bacteriana (Navon-Venezia *et al.*, 2017).

Gen *aac(6')-Ib*.

Las aminoglucósido 6'-N-acetiltransferasas tipo I son proteínas que inactivan a los aminoglucósidos, como amikacina pero no gentamicina, inhibiendo su acción bactericida por modificación en la molécula de estos compuestos (Sarno *et al.*, 2003; Mella *et al.*, 2004). En un estudio realizado en Chile con cepas de *K. pneumoniae* aisladas de IAAS reportaron un 69% de prevalencia de este gen (Díaz *et al.*, 2004).

Gen *aac(3)-II*.

La enzima modificadora de aminoglucósidos 3-N-acetiltransferasa es una proteína que confiere resistencia a las bacterias contra aminoglucósidos como gentamicina pero no contra amikacina (Mella *et al.*, 2004). Así, Díaz *et al.*, 2004 en un estudio realizado en *K. pneumoniae* con 100 cepas, reportó que esta proteína se encontró en el 39% de los casos, aunque no fue la más común, sí le confirió la resistencia contra tobramicina, dibekacina, netilmicina y sisomicina (Díaz *et al.*, 2004).

Transferencia horizontal de genes y la resistencia a antibióticos.

La adquisición de material genético de forma horizontal puede significar una ventaja metabólica o fisiológica para el organismo receptor (Andam *et al.*, 2011). Las bacterias pueden transferir información genética de manera intercelular por medio de 3 mecanismos: transformación, conjugación y transducción, pareciendo que bacterias de vida libre pueden utilizar al menos uno de estos. De igual forma, existen

dos mecanismos para la transferencia génica de forma intracelular: transposición, que se refiere al movimiento de juegos completos de genes del cromosoma o de un plásmido a otro; e integración de casetes, donde se media el ensamble y expresión de arreglos de genes en tándem (Summers, 2006).

El fenómeno de captura, acumulación y diseminación de genes de resistencia a antibióticos está ampliamente relacionado al intercambio de material genético de forma intercelular e intracelular, debido a la acción de elementos genéticos móviles (EGM). En dichos EGM, encontramos: transposones y secuencias de inserción, que son elementos pequeños de ADN capaces de moverse ellos mismos de forma casi aleatoria de una posición a otra en la misma o en una diferente molécula de ADN; integrones, que son elementos que movilizan genes usando recombinación sitio-específica; plásmidos, elementos conjugativos–integrativos o bacteriófagos (Partridge *et al.*, 2018).

La importancia de todos estos elementos, se ha observado, entre otros, en la resistencia a Fluoroquinolonas, con el descubrimiento de los determinantes de resistencia a quinolonas mediados por plásmido, *qnr*, en los que se ha visto que variantes como *qnrA* y *qnrB* se encuentran en casetes de integrones, vistos en todas partes del mundo (Summers, 2006).

3.1 Antecedentes específicos.

En un proyecto realizado en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC), perteneciente a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, a cargo de Pérez-Sánchez, en 2020, se trabajó con un total de 75 cepas aisladas de diferentes hospitales de dos estados de la República Mexicana. Del estado de Puebla: 60 cepas provinieron del Hospital Regional I.S.S.S.T.E., 3 cepas del Hospital I.S.S.S.T.E.P., 3 cepas del Hospital para el Niño Poblano (HPN) y 3 cepas del Laboratorio Clínico Especializado “Los Ángeles”. De la CDMX se

recolectaron 6 cepas del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla. De este banco de cepas, 69 en total fueron confirmadas como *K. pneumoniae* y 6 como *K. oxytoca*.

Nueve de las cepas de *K. pneumoniae* pertenecieron a la variante hipermucosa, pero en ninguna se encontró el gen *rmpA*, responsable principal de este fenotipo. De estas cepas 5 mostraron resistencia antimicrobiana.

Cuatro de las 69 cepas de *K. pneumoniae* (1 perteneciente al HPN y las 3 del Laboratorio Clínico Especializado “Los Ángeles”) fueron confirmadas como susceptibles a todos los antibióticos probados.

En todas las cepas (75) se determinó la presencia de los genes que codifican las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) SHV, TEM y CTX-M. El gen *bla*_{SHV} se encontró en el 93.3% (69/75) de las cepas, *bla*_{TEM} en el 80% (60/75) y *bla*_{CTX-M} en el 72% (54/75).

Se determinó resistencia a carbapenémicos en el 8.69% (6/69) de las cepas de *K. pneumoniae* y el 50% (3/6) de *K. oxytoca*, solo en 8 cepas se encontró el gen *bla*_{VIM}. Por secuenciación se logró determinar que dos cepas portaban la variante *bla*_{VIM-23}, que hasta el momento no había sido reportada en *Klebsiella*.

El 65.2% (43/69) de las cepas de *K. pneumoniae* de este estudio fueron resistentes tanto a cefalosporinas de tercera generación como aminoglucósidos y quinolonas. Sin embargo, 63 mostraron resistencia fenotípica a los aminoglucósidos probados (AN, GM, NN), y 58 a quinolonas (CIP, LVX, NOR, NA) pero, no se determinaron los genes que podrían estar involucrados en la resistencia a estas familias de antibióticos.

De igual forma, 2 cepas fueron aisladas del Centro Médico Nacional 20 de noviembre y fueron identificadas en el LMHyC como *Klebsiella pneumoniae*. De estas cepas, CM155, fue aislada de hemocultivo y mostró resistencia fenotípica a diversos antibióticos, entre ellos CIP y GM. La cepa CM175, fue aislada de catéter y presentó resistencia a NN.

En 2019, Domokos y colaboradores reportaron 53 cepas de *K. pneumoniae* y una cepa de *K. oxytoca* causantes de infecciones del sistema sanguíneo, en Hungría. Confirmaron género y especie por medio de MALDI-TOF/MS. Obtuvieron

concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) encontrando que todas las cepas presentaban resistencia a cefalosporinas de tercera generación y mostraban susceptibilidad reducida o resistencia a fluoroquinolonas. Realizaron estudios de PCR para determinar la presencia de genes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (RQMP); con esto, seleccionaron 5 cepas (4 *K. pneumoniae*: Kpn33, Kpn47, Kpn115 y Kpn125; y 1 *K. oxytoca*: Kox37) para secuenciarlas.

De acuerdo a lo reportado por aquel equipo de trabajo, las 5 cepas poseen genes de resistencia a aminoglucósidos, en todas se encontró el gen *aac(3)-IIa* y en 2 (Kpn33 y Kpn125) el gen *aac(6')-Ib*, que codifican para EMA. Para resistencia a quinolonas, encontraron en las 4 cepas de *K. pneumoniae* el gen *aac(6')-Ib-cr*, y en 5 cepas se determinó la presencia de alguna variante de los genes *qnr* (Kpn33 y Kpn125: *qnrB4*; Kpn47: *qnrB1* y Kox37: *qnrA1*).

Adicionalmente, utilizando PCR cuantitativa, midieron los grados de expresión relativa (GER) de los genes *qnr*. Emplearon como referencia los valores del ciclo umbral (C_T) del gen *rpoB* para normalizar los valores de C_T de los genes de su interés, determinado a las cepas Kpn33 y Kpn125 con las cifras más elevadas de GER, teniendo 9.74 y 3.75 veces, respectivamente, mientras que para Kpn47 se determinaron 2.34 veces.

Esta diferencia en los GER contribuyó a preguntar ¿si existe diferencia en los promotores presentes en dichos genes que pudieran influir en su expresión?, por esta razón, es que sería importante realizar una búsqueda bioinformática inicial de los posibles promotores de los genes *qnr* para establecer bases para posteriores estudios experimentales.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

K. pneumoniae multi-drogoresistente (MDR) es un patógeno emergente que ha incrementado su incidencia en las infecciones asociadas a la atención de la salud. Conocer la prevalencia de los genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos en cepas de *K. pneumoniae*, nos permitirá tener un panorama más amplio de la diseminación de estos genes en casos de infecciones de origen hospitalario. El

estudio de incidencia de estos genes de resistencia en cepas causantes de infecciones nosocomiales en el estado de Puebla permitirá obtener una explicación de cómo es la distribución de estos genes dentro de las instituciones participantes para poder implementar medidas preventivas evitando que estos genes se continúen diseminando.

El estudio bioinformático de los entornos genéticos y plásmidos de estos determinantes de resistencia permitirá inferir cómo es el mecanismo por el que se movilizan. De igual forma, el estudio de los posibles promotores de los genes *qnr* permitirá establecer bases para posteriores estudios experimentales.

5. HIPÓTESIS CIENTÍFICA.

El análisis bioinformático del entorno genético puede darnos información de la movilización de los genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos en el género *Klebsiella*; y la determinación de los posibles promotores de los genes *qnr* puede establecer pautas para futuros estudios a nivel experimental, que permitan conocer cómo afectan su expresión.

6. OBJETIVOS.

6.1 Objetivo General

Determinar la presencia de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas, así como los entornos genéticos de los genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-II* y *aac(6')-Ib*, estudiar los plásmidos portadores de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas y los posibles promotores de los genes *qnr* en cepas de *Klebsiella sp.*

Objetivos Específicos

- Identificar genes de resistencia a quinolonas (*qnrA*, *qnrB*) y a aminoglucósidos (*aac(6')-Ib*, *aac(3)-II*) en cepas de *Klebsiella sp.*
- Analizar plásmidos portadores de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en secuencias de genomas de *Klebsiella pneumoniae*.

- Analizar y comparar los entornos genéticos de los genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-II* y *aac(6')-Ib* entre las cepas del estudio.
- Buscar y comparar los posibles promotores de los genes *qnr* en las secuencias de las cepas portadoras.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

Amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas.

Obtención de ADN por métodos de ebullición.

Se cultivaron las cepas de estudio en placas de Agar Soya-Trypticaseína (TSA) utilizando la técnica de sembrado masivo, posteriormente, se dejaron incubar toda la noche a 37 °C. Para realizar la extracción de material genético, de los cultivos se tomó una asada grande de inóculo y se suspendió en 800 µl de solución salina isotónica (SSI) en un tubo eppendorf estéril de 1 ml, se homogenizó la muestra utilizando el vórtex y luego se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se volvió a suspender la pastilla celular en 800 µl de SSI con ayuda del vórtex; se repitió el mismo proceso 3 veces con el objetivo de realizar lavados a la muestra para eliminar el exceso de exopolisacáridos. Al terminar el tercer lavado, una vez decantado el último sobrenadante, se agregaron 800 µl de agua inyectable estéril (AIE; marca PISA) a la pastilla obtenida, volviendo a homogenizar. Se colocaron todas las muestras en baño de agua durante 10 minutos, posteriormente se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min. Se obtuvo el sobrenadante con ayuda de una pipeta y se traspasó a un nuevo tubo eppendorf estéril. Los lisados se guardaron a -20°C.

Cuantificación y ajuste de ADN.

Para determinar la concentración de ADN presente en los lisados anteriormente realizados se utilizó el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Antes de realizar la cuantificación, se calibró el lector utilizando 5 µl de agua inyectable estéril como

blanco. La concentración de ADN se determinó bajo las unidades de $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se utilizaron 2 μl de muestra para realizar las lecturas. Entre cada muestra, se limpió el lector para evitar lecturas alteradas.

Posteriormente, se ajustaron las muestras a una concentración final ($C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$) de 200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en un volumen final de 300 μl , utilizando agua inyectable estéril. Se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Amplificación de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas.

Las cepas que cumplieron con el perfil fenotípico de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos fueron sometidas a la amplificación por PCR para detectar la presencia de los genes *qnrA*, *qnrB*, *aac(6')-Ib* y *aac(3)-II*.

Se siguieron las condiciones de amplificación estandarizadas en el LMHyC, de acuerdo con las fuentes de las que se obtuvieron los oligonucleótidos (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos y condiciones a utilizar en la amplificación de los genes de interés.

Gen	Tamaño del producto esperado	Oligonucleótidos	Condiciones	Referencia
<i>qnrA</i>	657 pb	Sentido	95°C 5 min	Cattoir et. al., 2007
		AGAGGATTTCTCAGCCAGG	95°C 1 min	
		Antisentido	55°C 1 min	
		TGCCAGGCACAGATCTTGAC	72°C 1 min 72°C 7 min 40 c	
<i>qnrB</i>	681 pb	Sentido	95°C 5 min	Cattoir et. al., 2007
		GGMATHGAAATTCGCCACTG	95°C 1 min	
		Antisentido	56°C 1 min	
		TTTGCYGYCGCCAGTCGAA	72°C 1 min 72°C 7 min 35 c	
<i>aac(6')-Ib</i>	482 pb	Sentido	94°C 5 min	Park et. al., 2006
		TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	94°C 45 seg	
		Antisentido	60°C 45 seg	
		CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	72°C 45 seg 72°C 5 min 20 c	
<i>aac(3)-II</i>	237 pb	Sentido	94°C 5 min	Van de Klundert y Vliegenthart, 1993
		ACTGTGATGGGATACGCGTC	94°C 45 seg	
		Antisentido	60°C 45 seg	
		CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	72°C 45 seg 72°C 5 min 28 c	

Una vez obtenidos los productos de la PCR, se cargaron en geles de agarosa al 1% para observarlos por medio de una electroforesis, las muestras se corrieron a 100 V. No se utilizaron marcadores de peso molecular pues se contaba con cepas control para cada gen (Tabla 2). Los geles se tiñeron utilizando bromuro de etidio (BET), sumergiendo el gel de 10-15 segundos, y posteriormente se dejaron desteñir en agua estéril por 20 min, pasado este tiempo se observaron utilizando el fotodocumentador MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems.

Tabla 2. Cepas control utilizadas para la amplificación de los genes de interés.

Microorganismo	Cepa	Gen control	Fuente
<i>E. coli</i>	C7219	<i>qnrA</i>	Tesis de DoctoradoCortés-Cortés, 2016
<i>K. pneumoniae</i>	SA96	<i>qnrB</i>	Tesis de MaestríaGonzález-Jiménez, 2013
<i>E. coli</i>	C7226	<i>aac(6')-Ib</i>	Tesis de DoctoradoCortés-Cortés, 2016
		<i>aac(3)-II</i>	

Análisis bioinformático de secuencias de *K. pneumoniae* portadoras de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas.

Debido al inicio de la alerta sanitaria por Sars-Cov-2 en México, y el consecuente cierre de actividades presenciales en la Universidad, se procedió a realizar el análisis de los entornos genéticos de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas de nuestro interés, con el objetivo de comparar los diferentes mecanismos de transferencia por los que podrían estar siendo diseminados. De igual forma, se realizó la búsqueda de los promotores de los genes *qnr*, con la intención de observar si su expresión pudiera verse aumentada o disminuida por los genes aledaños a ellos.

Obtención de las secuencias.

Las 4 secuencias de *K. pneumoniae*, portadoras de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas, del proyecto de Domokos y colaboradores (2019) se

obtuvieron de la base de datos European Nucleotide Archive (ENA) por medio de los códigos de Biosample: SAMN10639440 (Kpn33), SAMN10639726 (Kpn47), SAMN10639736 (Kpn115) y SAMN10639737 (Kpn125).

Las secuencias de las dos cepas pertenecientes al Centro Médico Nacional 20 de noviembre (CM155, CM175), fueron proporcionadas por la D.C María Elena Bello López.

También, se obtuvieron 2 secuencias de plásmidos de *K. pneumoniae* de la base de datos del NCBI, una portadora del gen *qnrB1*, y otra con el gen *qnrB2* (EF219134, MT560062). Ambas secuencias ya contaban con anotación y registro.

Ensamble y anotación de los genomas.

Las secuencias que se obtuvieron fueron analizadas mediante procedimientos bioinformáticos. Se realizaron los ensamblajes de las 6 secuencias crudas que se tenían utilizando los softwares de libre acceso: SPAdes versión 3.9 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SPAdes/>) y Placnetw (<https://castillo.dicom.unican.es/upload/>).

Para realizar la anotación de los genomas, se utilizó la base de datos RAST (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), una plataforma de libre acceso.

Rastreo de genes de resistencia de interés.

Los genes de resistencia presentes en las secuencias de las cepas fueron rastreados utilizando la plataforma de libre acceso ResFinder 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>).

Determinación de los entornos genéticos.

Una vez localizados los genes de resistencia de interés dentro de los nodos/contigs de los 6 ensamblajes realizados, se verificaron utilizando la anotación previamente realizada. Se extrajeron las secuencias de los nodos del genoma para posteriormente ser analizados utilizando BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), y así compararlas con las reportadas en la base de datos del NCBI-Genbank.

En las 2 secuencias descargadas directamente del NCBI, se determinó la posición de los genes utilizando el buscador de la base de datos, observando el entorno de la anotación reportada.

Búsqueda de posibles promotores.

Para la búsqueda de promotores de los genes *qnr* se utilizaron las plataformas Bprom(<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) y PRODORIC (<http://www.prodoric.de/index.php?index=3>). Para realizar esto se obtuvo la secuencia de los genes *qnr*, junto con 100 pb río arriba. Posteriormente, para ampliar la búsqueda, también se incluyó la secuencia de los genes *pspF* y 100pb río arriba de secuencia intergénica de este último (si se encontraba presente).

8. Resultados.

Identificación de los genes de resistencia a aminoglucósidos en cepas de *K. pneumoniae*.

Se trabajó con un total de 65 cepas de *K. pneumoniae* provenientes de diferentes Instituciones de salud pública: 56 del Hospital Regional ISSSTE Puebla, 3 del Hospital ISSSTEP, 4 del Hospital IMSS Tlalnepantla y 2 del Hospital para el Niño Poblano. Parte de este banco de cepas mostró resistencia completa o intermedia a aminoglucósidos (AN, GM, NN) y/o quinolonas (CIP, NOR, LVX, NA) al aplicar el método de Kirby-Bauer (Pérez-Sánchez, 2020).

Específicamente en la resistencia presentada a aminoglucósidos, de las 65 cepas de *K. pneumoniae*, el 58.46% (38 cepas) presentó resistencia o susceptibilidad intermedia a AN, el 87.69% (57 cepas) a GM y el 95.38% (62 cepas) a NN (Pérez-Sánchez, 2020).

En general, el 96.92% (63 cepas) presentó resistencia a alguno de los aminoglucósidos utilizados. A estas 63 cepas se les realizó la prueba de PCR para la detección de los genes *aac(6')-Ib* y *aac(3)-II*, que codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos, esperando productos de 428 pb y 237 pb,

respectivamente. Se utilizó a la cepa C7226 como control positivo. El 80.95% (51/63 cepas) fueron positivas a la presencia de *aac(6')-Ib* (Figura 2).

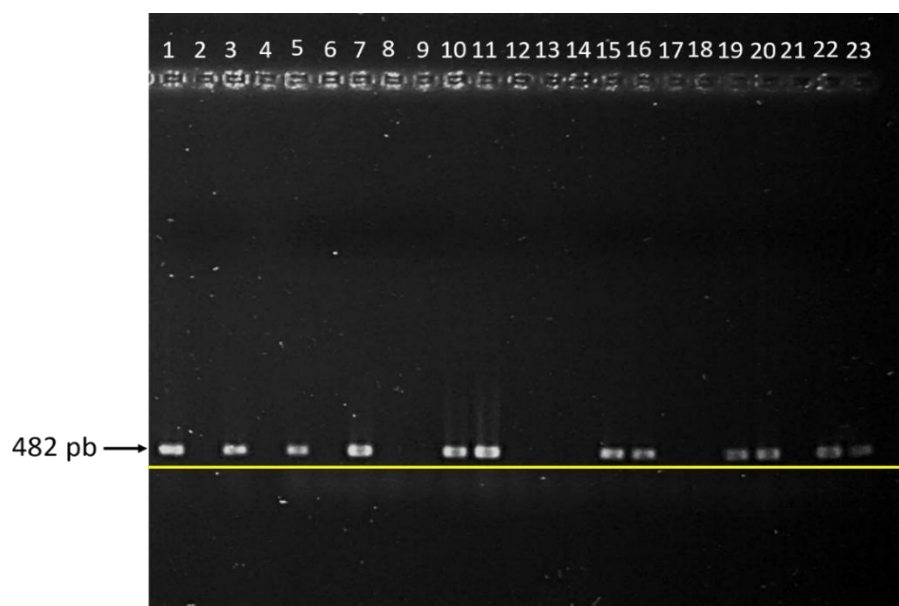


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del gen *aac(6')-Ib*. Carril 1: control positivo (C7226), carril 2: blanco, carril 3: KpE62, carril 4: vacío, carril 5: KpE64, carril 6: KpE66, carril 7: KpE67, carril 8: KpE68, carril 9: KpE69, carril 10: KpE70, carril 11: KoE73, carril 12: KpE74, carril 13: KpE76, carril 14: KpE77, carril 15: KpE78, carril 16: KpE79, carril 17: KpE80, carril 18: Kp81, carril 19: KpP2, carril 20: KpP6, carril 21: KpP7, carril 22: KpN29, carril 23: KpN39.

En el caso del gen *aac(3)-II*, el 74. 6% (47/63 cepas) fueron positivas (Figura 3).

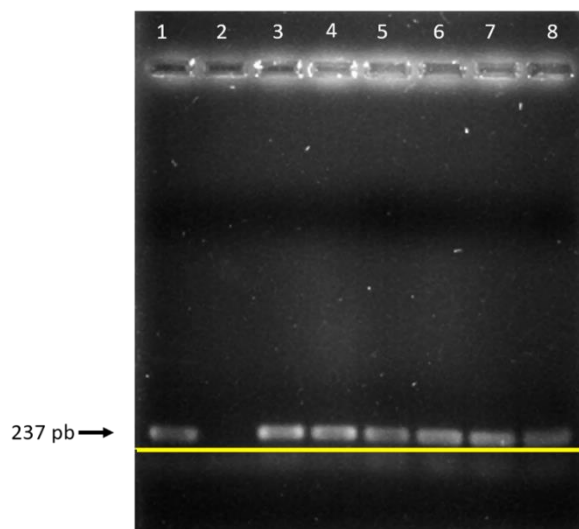


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del gen *aac(3)-II*. Carril 1: control positivo (C7226), carril 2: blanco, carril 3: KpS1, carril 4: KpS2, carril 5: KpS3, carril 6: KoS4, carril 7: KpS5, carril 8: KoS6.

De las 61 cepas positivas a *aac(6')-Ib*, 43 provienen del hospital ISSSTE (43/54), 2 del HPN (2/2), 4 de hospital IMSS Tlanepantla (4/4) y 2 del hospital ISSSTEP (2/3). Mientras que para *aac(3)-II*, de las 47 cepas positivas 38/54 provienen del hospital ISSSTE, 4/4 del hospital IMSS Tlanepantla, 2/3 del hospital ISSSTEP y ninguna del HNP (Figura 4).

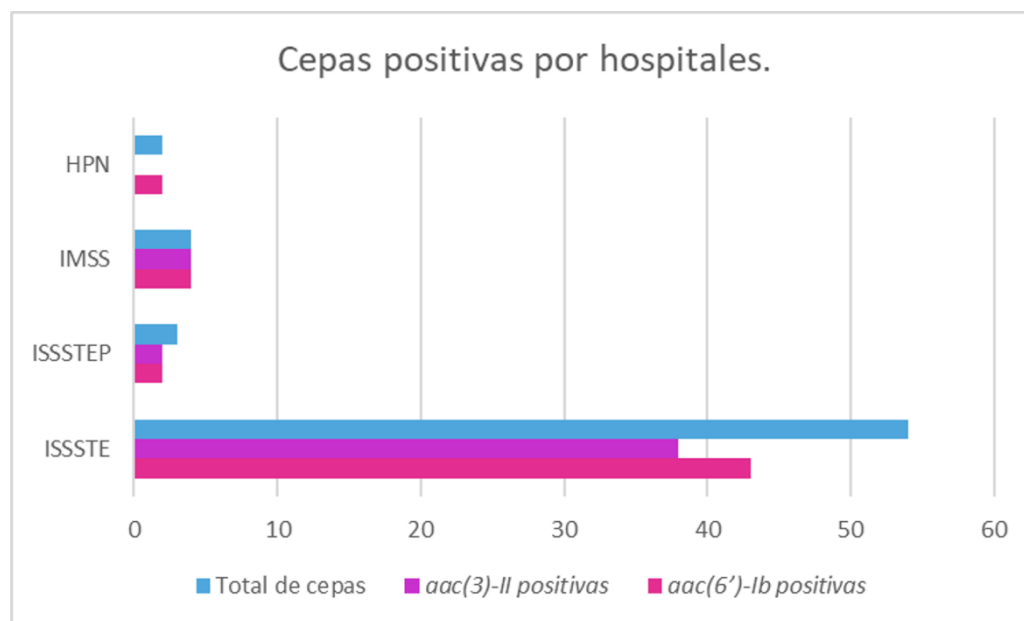


Figura 4. Número de cepas de *K. pneumoniae* positivas a los genes de resistencia a aminoglucósidos de interés. De un total de 63 cepas: 54 del Hospital ISSSTE, 4 del hospital IMSS Tlanepantla, 3 del hospital ISSSTEP y 2 del HNP.

Identificación de los genes de resistencia a quinolonas en cepas de *K. pneumoniae*.

El 84.61% (55/65) de las cepas de *K. pneumoniae* presentó resistencia o susceptibilidad intermedia a los antibióticos pertenecientes a la familia de las quinolonas. Específicamente el 64.51% (42 cepas) mostró resistencia a LVX, el 81.53% (53 cepas) a NOR, y el 84.61% (55 cepas) a CIP y NA (Pérez-Sánchez, 2020).

Por lo que a 55 cepas se les realizó la prueba de PCR para la detección de los genes *qnrA* y *qnrB*, que codifican para la síntesis de proteínas Qnr, cuya importancia recae en la protección de los blancos farmacológicos de las quinolonas, evitando su acción. Ninguna cepa fue positiva al gen *qnrA*. Sin embargo, en el 90.9% (50/55 cepas) se encontró el gen *qnrB* (43/55 del hospital ISSSTE, 1/1 del HNP, 3/4 del hospital IMSS Tlanepantla y 3/3 del hospital ISSSTEP) (Figura 5). En 5 cepas no se detectó ninguno de los genes buscados, a pesar de reportar resistencia completa o intermedia a las quinolonas probadas.

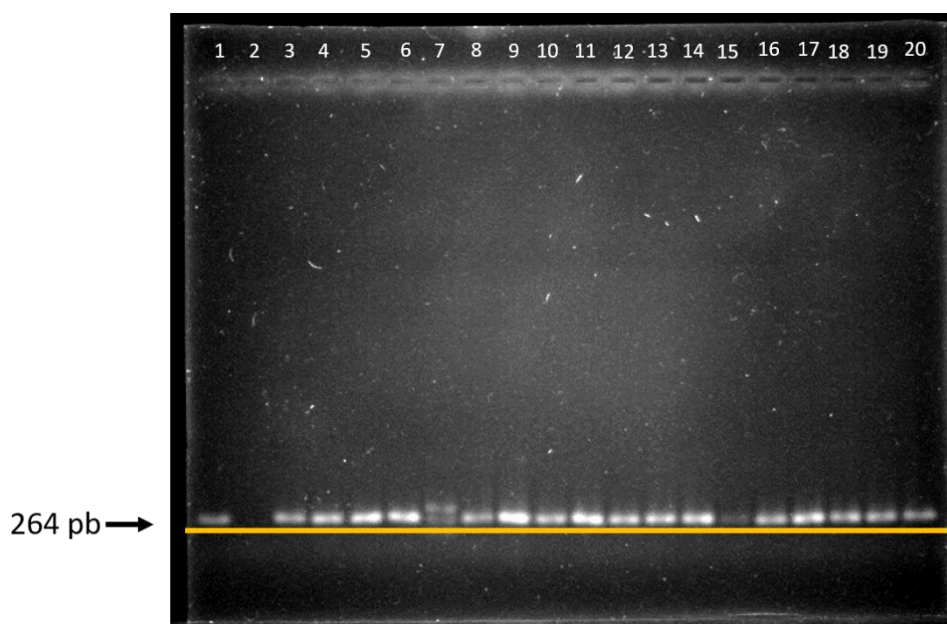


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del gen *qnrB*. Carril 1: control positivo (SA96), carril 2: blanco, carril 3: KpE16, carril 4: KpE19, carril 5: KpE23, carril 6: KpE25, carril 7: KpE26, carril 8: KpE28, carril 9: KpE31, carril 10: KpE32, carril 11: KpE33, carril 12: KpE38, carril 13: KpE39, carril 14: KpE40, carril 15: KpE41, carril 16: KpE42, carril 17: KpE44, carril 18: KpE45, carril 19: KpE46, carril 20: KpE47.

En resumen, de los genes buscados para resistencia a aminoglucósidos, en 63 cepas, el 80.95% fue positivo a *aac(6')-Ib* y el 74.6% a *aac(3)-II*; mientras que de 55 cepas a las que se les buscaron genes de resistencia a quinolonas, el 90.9% fue positivo a *qnrB* y en ninguna se encontró *qnrA* (Figura 6).

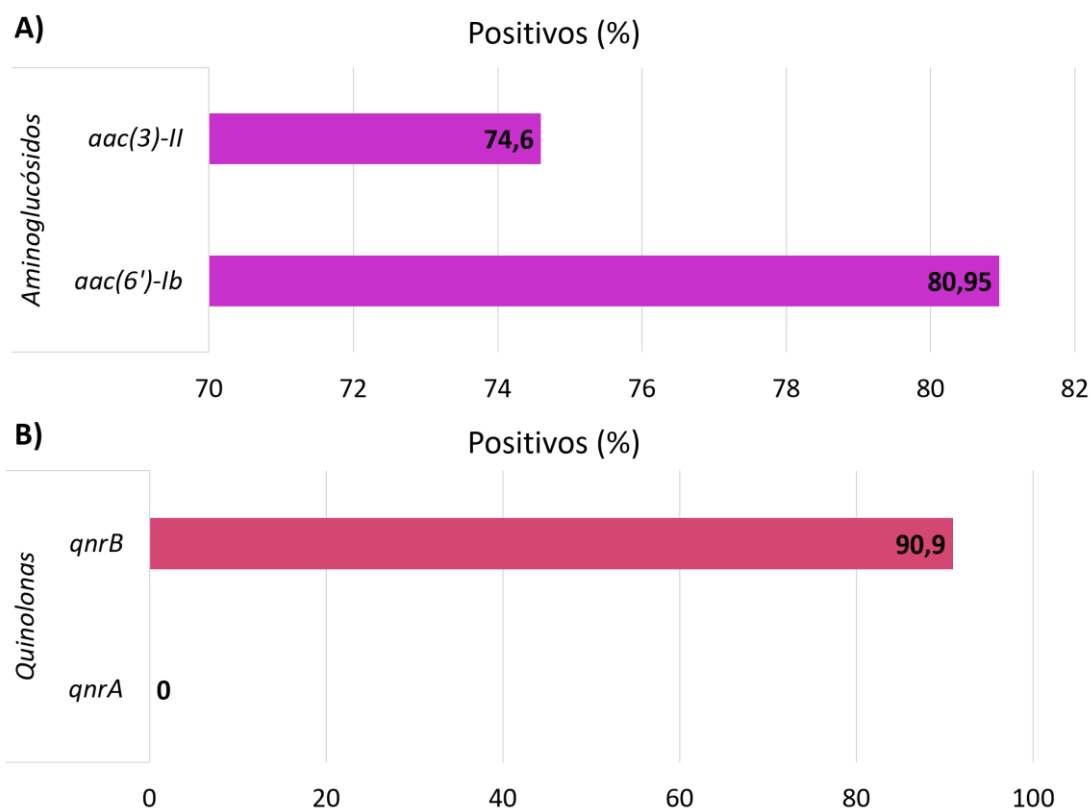


Figura 6. Porcentajes de cepas positivas a los genes de interés. A) De un total de 65 cepas, se muestran los porcentajes de positivas a los genes *aac(3)-II* (51/63) y *aac(6')-Ib* (47/63). B) Porcentajes, de un total de 55 cepas, positivas a los genes *qnrA* (0/55) y *qnrB* (50/55).

Identificación de los genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *K. oxytoca*.

Se estudiaron 6 cepas de *K. oxytoca*: 4 del Hospital Regional ISSSTE Puebla y 2 del Hospital IMSS Tlalnepantla.

En las 6 cepas de *K. oxytoca*, el 66.66% (4 cepas) presentaron resistencia o susceptibilidad intermedia a AN, el 83.33% (5 cepas) a GM y el 100% (6 cepas) a NN (Pérez-Sánchez, 2020). A las 6 cepas se les buscaron los genes *aac(6')-Ib* y *aac(3)-II*, obteniendo un 100% de positivos para *aac(6')-Ib* (4/4 del hospital ISSSTE, y 2/2 de hospital IMSS Tlalnepantla) y un 50% (3/6 cepas) de positivas para *aac(3)-II* (1/4 del hospital ISSSTE y 2/2 del hospital IMSS Tlalnepantla).

Del total de 6 cepas de *K. oxytoca*, el 50% (3 cepas) presentó resistencia a CIP y NA, mientras que el 16.66% (1 cepa) a LVX y NOR (Pérez-Sánchez, 2020). Por esto, 2 cepas fueron seleccionadas para buscar la presencia de los genes *qnrA* y *qnrB*. En ninguna se encontró el gen *qnrA*, aun así, en ambas (100%) se detectó el gen *qnrB*.

Análisis bioinformático de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a quinolonas y aminoglucósidos.

Debido a la emergencia sanitaria y al cierre de actividades presenciales en la universidad, se decidió realizar el análisis bioinformático de los plásmidos y entornos genéticos de los genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas, así como de los posibles promotores de los genes *qnr*.

Se utilizaron las secuencias de las cepas Kpn33, Kpn47, Kpn115 y Kpn125 del trabajo de Domokos *et al.*, 2019. De nuestra colección, se analizaron las secuencias de la cepa CM155, portadora del gen *qnrB1*, y de la cepa CM175, portadora del gen *aac(6')-Ib-cr*. Adicionalmente, se analizaron los plásmidos de *K. pneumoniae*: pRIVM_C014906_2 (portador del gen *qnrB1*) y pJIE137 (portador del gen *qnrB2*), cuyas secuencias y anotaciones fueron obtenidas del NCBI.

Las 6 secuencias de las cepas Kpn33, Kpn47, Kpn115, Kpn125, CM155 y CM175 fueron ensambladas utilizando 2 ensambladores diferentes, sin embargo, se decidió trabajar con los ensamblajes hechos con SPAdes 3.9, debido a que los contigs donde se encontraban nuestros genes de interés eran de mayor longitud, a comparación de los ensamblajes obtenidos de Placnetw.

Los ensamblajes se analizaron utilizando el software ResFinder para conocer la posición de los genes de interés dentro de los contigs obtenidos (Tabla 3).

Tabla 3. Posición de los genes de interés en los nodos de los ensambles.

Cepa	Gen	Nodo
Kpn33	<i>qnrB4</i>	28
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	47
	<i>aac(3)-IIa</i>	63
Kpn47	<i>qnrB1</i>	28
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	37
	<i>aac(3)-IIa</i>	35
Kpn115	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	48
	<i>aac(3)-IIa</i>	45
Kpn125	<i>qnrB4</i>	25
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	51
	<i>aac(3)-IIa</i>	71
CM155	<i>qnrB2</i>	40
CM175	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	55

Análisis de los entornos genéticos de *qnrB*.

Cepas portadoras de *qnrB4*.

El análisis de las secuencias de las cepas Kpn33 y Kpn125, muestra que son portadoras el gen *qnrB4* y se presenta dentro del mismo entorno genético (Figura 7). En ambas cepas, *qnrB4* se encuentra dentro de un Integrón Clase 1 Complejo (IC1C).

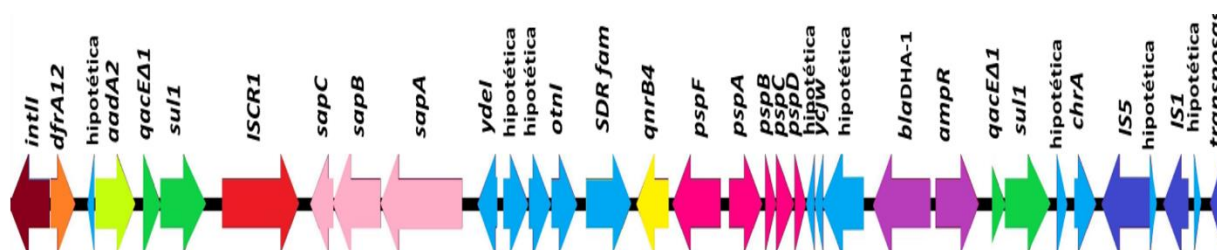


Figura 7. Entorno del gen *qnrB4*. Longitud: 24401 pb. Las cepas Kpn33 y Kpn125 presentaron el mismo entorno circundante del gen *qnrB4*. Para conseguir la estructura completa del Integrón Clase 1 Complejo, se utilizó Mauve para conectar los extremos de los dos contigs en los que se encontraba. Código de colores: Amarillo: *qnrB4*; Rojo oscuro: *intI1*; Naranja: *dfrA12*; Verde: Región constante 3' (*qacEΔ1*, *sul1*); Rosa: operon *sap*; Magenta: operón *psp*; Lila: *blaDHA-1* y su regulador *ampR*; Azul rey: transposasas, Azul cielo: otras proteínas. Figura realizada utilizando EasyFig.

Dentro de este elemento movilizable, podemos observar la presencia de otros genes de resistencia a antibióticos de diversas clases, como son: *blaDHA-1*, con su regulador *ampR*; *dfrA12*; *aadA2* y *sul1*. Entre los elementos cercanos al gen, podemos encontrar el operón *pspABCD* que codifica para las proteínas para PspA, PspB, PspC y PspD. Junto a *qnrB4*, encontramos el gen *pspF*, que codifica para el regulador transcripcional del operón *pspABCD*. Recalcando, el gen *pspF* se encuentra en la misma dirección que el gen *qnrB4* y la distancia entre ambos genes es aproximadamente < 100pb.

Cepas portadoras de *qnrB2*.

En la cepa CM155 y el plásmido pJIE137 se encontró el gen *qnrB2*, dentro de un IC1C (Figura 8), pero a diferencia de las cepas Kpn33 y Kpn125, esta estructura presenta un menor número de genes.

En CM155 específicamente, aparte de *qnrB2*, se observan otros genes de resistencia a antibióticos como *dfrA25* y *sul1*. En ambas secuencias también podemos observar la presencia de transposasas y la secuencia de inserción IS6. En contraste con Kpn33 y Kpn125, no se observa la presencia del operón *pspABCD*, sin embargo, río abajo del gen *qnrB2*, sí se encuentra el gen *pspF*, pero su secuencia está incompleta al perderse más de la mitad. No existe secuencia intergénica entre *pspF* y el siguiente gen, *qacΔE1*, además ambos genes se orientan en direcciones diferentes. El gen *qacΔE1* también se encuentra incompleto, perdiendo parte de su región N-terminal (Figura 8A).

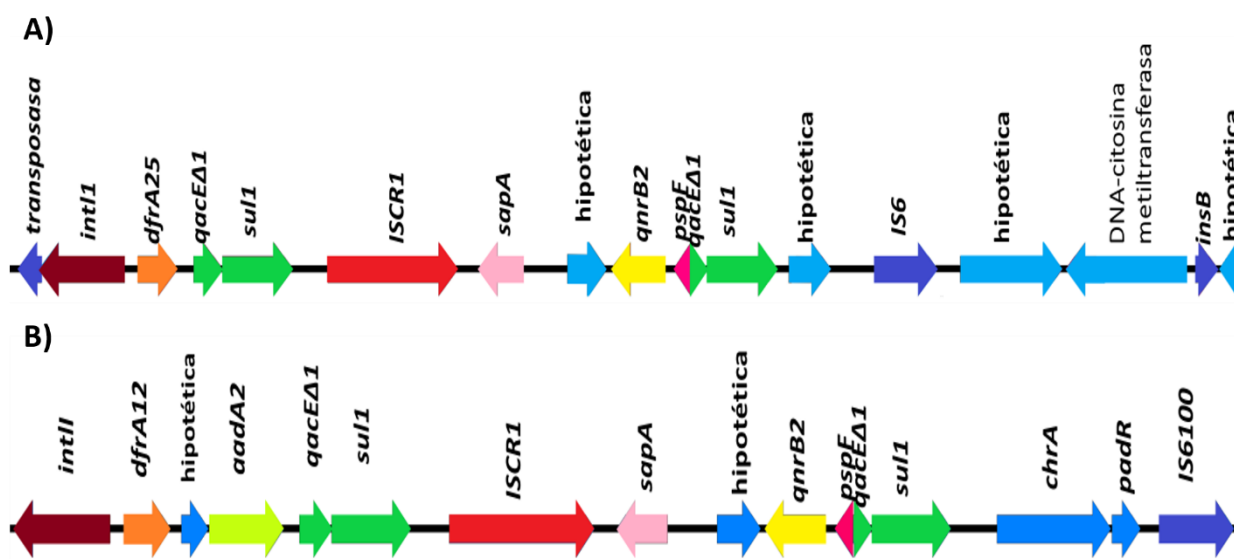


Figura 8. Entorno del gen *qnrB2*. A) cepa CM155 (15544 pb). B) plásmido PJIE137 (13001 pb). Ambos presentaron el gen *qnrB2* dentro de un Integrón Clase 1 Complejo. Código de colores: Amarillo: *qnrB4*; Rojo oscuro: *intI1*; Naranja: *dfrA12/dfrA25*; Verde: Región constante 3' (*qacΔE1*, *sul1*); Rosa: operon *sap* (incompleto); Magenta: operón *psp* (incompleto); Verde limón: *aadA2*; Azul rey: transposasas, Azul cielo: otras proteínas. Figura realizada utilizando EasyFig.

En el plásmido pJIE137, dentro del IC1C donde se encuentra *qnrB2*, también hay otros genes de resistencia a antibióticos como *dfrA12* y *aadA2* (genes que también se encuentran en Kpn33 y Kpn125). Se pueden observar los mismos genes que en la cepa CM155 en la región río abajo desde *ISCR1*, e incluso los genes *pspF* y *qacΔE1* se encuentran en las mismas condiciones, incompletos y sin secuencia intergénica entre ambos (Figura 8B).

Análisis de los entornos genéticos de *aac(6')-lb-cr* y *aac(6')-lb*.

En los resultados de ResFinder (Tabla 3), encontramos que las cepas Kpn33, Knp47, Kpn115 y Kpn125 poseen el gen *aac(6')-lb-cr*, como se reportó por Domokos *et al.*, 2019. Sin embargo, Kpn33 y Kpn125 también reportan el gen *aac(6')-lb* en el mismo nodo (Tabla 3). Al revisar los porcentajes de identidad de ambos genes en estas 2 cepas, encontramos que en los nodos de interés (Nodo_47: Kpn33 y Nodo_51: Kpn125), la identidad con el gen de la *aac(6')-lb* es de 100%, mientras que para *aac(6')-lb-cr* es de 99.422% (Anexo 4).

Por esta razón, se realizó el alineamiento de las secuencias de los nodos, donde se localizaban ambos genes, junto con las secuencias de *aac(6')-lb* (número de acceso NCBI: M21682 REGIÓN 380..985) y *aac(6')-lb-cr* (número de acceso NCBI: EF636461 REGIÓN 1124..1642) reportadas en el NCBI y referencias utilizadas por la base de datos de ResFinder (Figura 10).

Nodo_47	atgagtattcaacatttccaacaaagttaggcatcacaaagtacagcatcgtgaccaac	60
aac(6')-Ib	atgagtattcaacatttccaacaaagttaggcatcacaaagtacagcatcgtgaccaac	60
aac(6')-Ib-cr	-----	0
Nodo_47	agcaacgattccgtcacactgcgcctcatgactgagcatgaccttgcgatgctctatgag	120
aac(6')-Ib	agcaacgattccgtcacactgcgcctcatgactgagcatgaccttgcgatgctctatgag	120
aac(6')-Ib-cr	-----atgactgagcatgaccttgcgatgctctatgag	33

Nodo_47	tggctaaatcgatctcatatcgtcgagtgggtggggcggagaagaagcacgccgacactt	180
aac(6')-Ib	tggctaaatcgatctcatatcgtcgagtgggtggggcggagaagaagcacgccgacactt	180
aac(6')-Ib-cr	tggctaaatcgatctcatatcgtcgagtgggtggggcggagaagaagcacgccgacactt	93

Nodo_47	gctgacgtacaggaacagtacttccaagcgttttagcgcaagagtcgctactccatac	240
aac(6')-Ib	gctgacgtacaggaacagtacttccaagcgttttagcgcaagagtcgctactccatac	240
aac(6')-Ib-cr	gctgacgtacaggaacagtacttccaagcgttttagcgcaagagtcgctactccatac	153

Nodo_47	attgcaatgctgaatggagagccgattgggtatgccagtcgtacgttgctcttgaagc	300
aac(6')-Ib	attgcaatgctgaatggagagccgattgggtatgccagtcgtacgttgctcttgaagc	300
aac(6')-Ib-cr	attgcaatgctgaatggagagccgattgggtatgccagtcgtacgttgctcttgaagc	213

Nodo_47	ggggacggatggtgggaagaagaaccgatccaggagtacgcggaatagaccagttactg	360
aac(6')-Ib	ggggacggatggtgggaagaagaaccgatccaggagtacgcggaatagaccagttactg	360
aac(6')-Ib-cr	ggggacggatggtgggaagaagaaccgatccaggagtacgcggaatagaccagttactg	273

Nodo_47	gcgaatgcatcacaactgggcaaaggcttgggaaccaagctgggttcgagctctggttgag	420
aac(6')-Ib	gcgaatgcatcacaactgggcaaaggcttgggaaccaagctgggttcgagctctggttgag	420
aac(6')-Ib-cr	gcgaatgcatcacaactgggcaaaggcttgggaaccaagctgggttcgagctctggttgag	333

Nodo_47	ttgctgttcaatgatcccgaggtcaccaagatccaacggaccgctgccgagcaacttg	480
aac(6')-Ib	ttgctgttcaatgatcccgaggtcaccaagatccaacggaccgctgccgagcaacttg	480
aac(6')-Ib-cr	ttgctgttcaatgatcccgaggtcaccaagatccaacggaccgctgccgagcaacttg	393

Nodo_47	cgagcgatccgatgctacgagaaagcggggtttgagaggcaaggtagcgttaaccacccca	540
aac(6')-Ib	cgagcgatccgatgctacgagaaagcggggtttgagaggcaaggtagcgttaaccacccca	540
aac(6')-Ib-cr	cgagcgatccgatgctacgagaaagcggggtttgagaggcaaggtagcgttaaccacccca	453

Nodo_47	gatgggtccagccgtgtacatggttcaaacacgccaggcattcgagcgaacacgcagtgtt	600
aac(6')-Ib	gatgggtccagccgtgtacatggttcaaacacgccaggcattcgagcgaacacgcagtgtt	600
aac(6')-Ib-cr	tatgggtccagccgtgtacatggttcaaacacgccaggcattcgagcgaacacgcagtgtt	513

Nodo_47	gcctaa	606
aac(6')-Ib	gcctaa	606
aac(6')-Ib-cr	gcctaa	519

Figura 10. Alineamiento de secuencias de nucleótidos. Se alinearon las secuencias del Nodo_47 de Kpn33 con las secuencias de *aac(6')-Ib* (M21682) y *aac(6')-Ib-cr* (EF636461).

Adicionalmente, se realizó el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de AAC(6')-Ib y AAC(6')-Ib-cr con la de la proteína codificada en los nodos de interés, observando que en Kpn33 y Kpn125, no se encuentran las mutaciones Trp102Arg y Asp179Tyr, características de AAC(6')-Ib-cr (Figura 11).

Con esto, se corroboró que las cepas Kpn33 y Kpn125 únicamente portan el gen *aac(6')-Ib*.

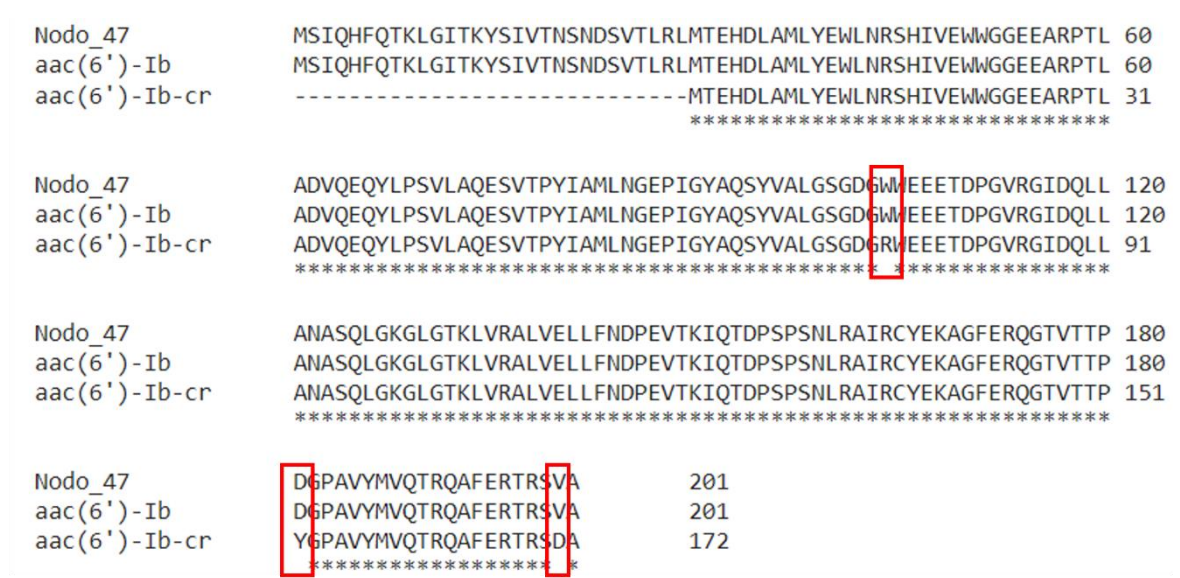


Figura 11. Alineamiento de secuencias de aminoácidos. Se alinearon los aminoácidos de la proteína encontrada en el Nodo_47 de Kpn33 con las secuencias de *aac(6')-Ib* (M21682) y *aac(6')-Ib-cr* (EF636461).

El gen *aac(6')-Ib-cr* solo se encuentra en las cepas Kpn47 y Kpn115, al igual que en la cepa CM175. En las 3 secuencias el gen se encuentra rodeado del mismo entorno (Figura 12). El gen *aac(6')-Ib-cr*, se encuentra flanqueado por secuencias de inserción IS26, y está acompañado de los genes *bla_{OXA-1}* y *catB3*.



Figura 12. Entorno de los genes *aac(6')-Ib-cr*. (2440 pb). Entorno reportado en las cepas Kpn47, Kpn115 y CM175. Código de colores: Morado: *bla_{OXA-1}*; Naranja: *catB3*; Verde limón: *aac(6')-Ib-cr*; Azul rey: transposasas. Figura realizada utilizando EasyFig.

Por otro lado, las secuencias de las cepas Kpn33 y Kpn125 poseen el gen *aac(6')-Ib* (Figura 13).

En ambas secuencias se observa el mismo entorno: río arriba de *aac(6')-Ib* se encuentran otros genes de resistencia, como *aadA1*, *bla_{OXA-9}* y *bla_{TEM-1}*. Existe la presencia de transposasas y el operón *merCADE*, que codifica para proteínas de resistencia a mercurio. También se presentan Tn21 y TniA.

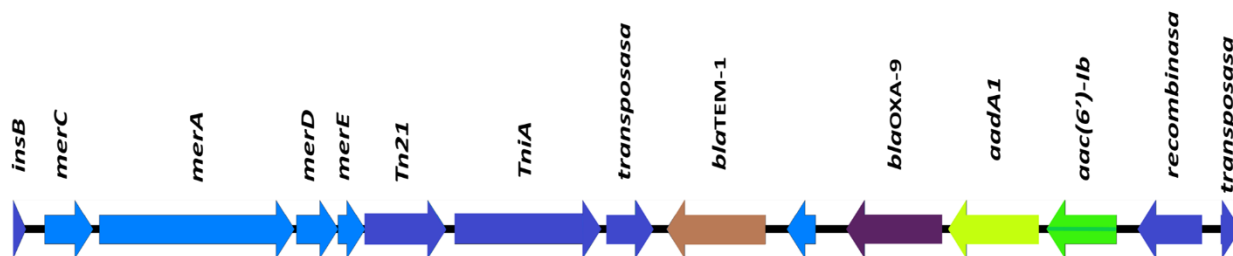


Figura 13. Entorno de los genes *aac(6')-Ib*. (10778 pb). Entorno reportado en las cepas Kpn33 y Kpn125. Código de colores: Morado: *bla_{OXA-9}*; Verde limón con franja verde: *aac(6')-Ib*; Azul rey: transposasas; Amarillo-verde: *aadA1*; Café: *bla_{TEM-1}*; Azul cielo: otras proteínas. Figura realizada utilizando EasyFig.

Análisis de los entornos genéticos de *aac(3)-II*.

Fueron 4 las secuencias (Kpn33, Kpn47, Kpn115 y Kpn125) con el gen *aac(3)-IIa*, y en todas podemos observar el mismo entorno (Figura 14).

El gen de interés se encuentra flanqueado por secuencias de inserción IS26 e IS3. También podemos observar la presencia de una proteína hipotética.

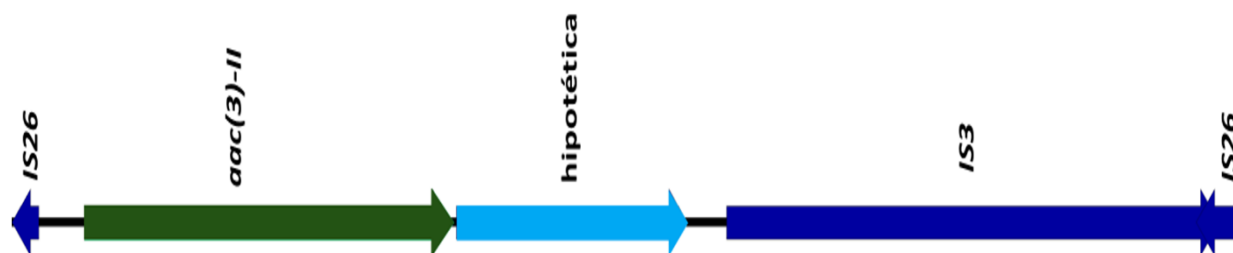


Figura 14. Entorno de los genes *aac(3)-II*. (2886 pb). Entorno reportado en las cepas Kpn33, Kpn47, Kpn115 y Kpn125. Código de colores: Verde: *aac(3)-II*; Azul rey: transposasas; Azul cielo: otras proteínas. Figura realizada utilizando EasyFig.

Plásmidos portadores de genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos.

El análisis de los plásmidos portadores de genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos en las secuencias de las cepas Kpn33, Kpn115, Kpn125, Kpn47, CM155 y CM175, no fue posible realizar debido a que los ensamblajes no fueron adecuados para lograr armar los plásmidos de forma correcta. Por eso, se procedió a buscar plásmidos reportados en la base de datos del NCBI, con secuencia completa y circulares, identificados en cepas de *K. pneumoniae*, principalmente, portadores de genes *qnrB* (Tabla 4).

Se analizaron 14 plásmidos, que han sido aislados de cepas de diferentes partes del mundo, del continente asiático, americano o europeo. Aunque en su mayoría han sido aislados de humanos cursando por IAAS, también se han aislado de biosólidos y granjas de aves de corral, lo que sugiere que los genes se podrían transmitir tanto en cepas hospitalarias, como en ambientales. Al menos 10 de estos plásmidos son conjugativos.

De igual forma, 12 de los plásmidos portan al menos un gen de resistencia a betalactámicos, como codificantes de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) del tipo TEM o CTX-M, carbapenemasas como OXA, metalo-betalactamasas como NDM o betalactamasas de tipo AmpC como DHA-1.

Al mismo tiempo, podemos observar que algunos portan en conjunto genes de resistencia a aminoglucósidos. Como los de nuestro interés *aac(6')-Ib* y *aac(3)-II*, al igual genes que codifican para otras clases de EMA, tanto del tipo nucleotidiltransferasas (*aadA2*) como fosfotransferasas (*aph(6)-Id*). También se observan genes de resistencia a macrólidos, rifampicina, trimetoprim, sulfamidas, tetraciclinas o cloranfenicol. El plásmido con el mayor número de genes de resistencia fue pKP3301, con un tamaño de 276950 pb, y fue portador del gen *qnrB1*.

Los genes *qnrB* se han detectado en plásmidos de grupos de incompatibilidad diversos, como IncR, IncC, IncL/M, IncHI1B-like, o el grupo IncF, siendo este último

el reportado con mayor frecuencia. En su mayoría se trata de plásmidos con un tamaño mayor a 100000 pb, aunque la variante *qnrB19* se ha aislado de un plásmido de sólo 2750 pb.

Tabla 4. Plásmidos reportados en *K. pneumoniae* con determinantes de RQMP *qnrB*.

Plásmido	Grupo	Tamaño	Genes de resistencia a:				Conjugativo	Origen	Hospedero	Referencia	No. Acceso
			Quinolonas	Aminoglucósidos	Betalactámicos	Otros antibióticos					
pKPX-2 DNA	IncF	141545 bp	<i>aac(6')-lb-cr qnrB</i>	<i>aac(3)-II, aph(3'')-lb</i>	<i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> OXA-1, <i>bla</i> TEM-1	<i>catB4, tetA/R, sul2</i>	Sí	Taiwan/India	Humano	Huang <i>et al.</i>	AP012056
pKC3-1/2b	IncC	193802 bp	<i>qnrB4</i>	<i>aadA1</i>	<i>bla</i> OXA-10, <i>bla</i> DHA-1,	<i>dfrA14, arr2, cmlA1, sul1, mph(A), Tn21mer</i>	Sí	China	Aves de corral	Zhang <i>et al.</i>	MT560001
pKP3301	IncHI1B-like	296750 bp	<i>aac(6')lb-cr qnrB1</i>	<i>aadA2, aph(3')-Via, aac(6')-lb</i>	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> CTX-M-15	<i>armA, msr(E), mph(E), sul1, dfrA12, cat, dfrA1, dfrA14, tetD</i>	Sí	Tailandia	Humano	Sakamoto <i>et al.</i>	AP018748
pKPSH11	IncF	186474 bp	<i>qnrB</i>	<i>strA, strB, aac(3)-II, aac(6')-lb</i>	<i>bla</i> OXA-1, <i>bla</i> CTXM-15, <i>bla</i> TEM-208	<i>tetA/R</i>	Sí	Israel	Biosólidos	Kaplan <i>et al.</i>	KT896504
pKPN-c22	-	178563 bp	<i>aac(6')-lb-cr qnrB1</i>	-	<i>bla</i> OXA-1	<i>tetA/R</i>	Sí	EUA	Humano	Conlan <i>et al.</i>	NZ_CP009879
pKDO1	IncFIIK	127509 bp	<i>aac(6')-lb-cr qnrB1</i>	<i>strA, strB, aac(3)-II</i>	<i>bla</i> OXA-1, <i>bla</i> CTXM-15, <i>bla</i> TEM-1	<i>tetA/R, catB3</i>	Sí	República Checa	Humano	Dolejska <i>et al.</i>	NC_019389.1
p6234-198.371	-	198371 bp	<i>aac(6')-lb-cr5 qnrB1</i>	<i>aph(3'')-lb, aph(6)-ld, aac(3)-Ile</i>	<i>bla</i> TEM-1, <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> OXA-1	-	Sí	Colombia	Humano	McCorrison <i>et al.</i>	NZ_CP010390
pKPS30	IncR	61228 bp	<i>aac(6')-lb-cr qnrB4</i>	<i>aph(3')-I</i>	<i>bla</i> DHA-1, <i>bla</i> TEM-1, <i>bla</i> SHV-12	<i>mph(R), mrx, mph(A), tetA/R, sul1, arr3, catB3</i>	No	Francia	Humano	Compain <i>et al.</i>	NC_023314
pCNR341	IncL/M	79416 bp	<i>qnrB4</i>	-	<i>bla</i> DHA-1	<i>sul1</i>	Sí	Francia	Humano	Hennequin <i>et al.</i>	NZ_LT994833
pRIVM_C014906_2	-	105291 bp	<i>aac(6')-lb-cr qnrB1</i>	<i>aac(3)-IIa</i>	<i>bla</i> OXA-1	<i>tetA/R, catB4, dfrA14, arr3</i>	Sí	Países Bajos/ Caribe	Humano	Hendrickx <i>et al.</i>	NZ_MT560062
pKPN1482-1	IncFIIK	180210 bp	<i>qnrB1</i>	<i>aac(6')-lb</i>	-	<i>arr-2, catB</i>	Sí	EUA	Humano	Long <i>et al.</i>	NZ_CP020842
pRIVM_C014947_7	-	2750 bp	<i>qnrB19</i>	-	-	-	No	Caribe	Humano	Hendrickx <i>et al.</i>	NZ_MT560070
pYDC676	IncR	50182 bp	<i>qnrB4</i>	<i>strA, strB</i>	<i>bla</i> DHA-1	<i>armA, msr(E), mph(E), sul1</i>	No	EUA	Humano	Guo <i>et al.</i>	KT225462
pNDM-MAR	IncHI1B-like	267242 bp	<i>qnrB1</i>	<i>aac(6')-lb</i>	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> OXA-1	<i>catB3</i>	Sí	Marruecos	Humano	Carattoli <i>et al.</i>	JN420336

Búsqueda de posibles promotores.

Domokos y colaboradores, en 2019, utilizando PCR cuantitativa, midieron los grados de expresión relativa (GER) de genes *qnr*. Determinaron que la cepa Kpn33 expresaba 9.74 veces el gen *qnrB4*, la cepa Kpn125 presentó 3.75 veces expresión del gen *qnrB4*, mientras que para Kpn47 se determinaron 2.34 veces el gen *qnrB1*. El gen control utilizado fue *rpoB*.

Por esta diferencia en los GER es que se procedió a buscar los posibles promotores de los genes *qnr*, con el objetivo de determinar si existían diferencias que pudieran explicar las variaciones de su expresión reportadas por el trabajo de Domokos. Para realizar la búsqueda, se utilizaron dos bases de datos: Bprom y Virtual footprint de PRODORIC.

Posibles promotores para *qnrB4*.

En las cepas Kpn33 y Kpn125, con *qnrB4*, se encontraron los mismos resultados en ambas bases de datos al contener la misma secuencia. Se introdujo la secuencia de *qnrB4* junto con 100 pb río arriba para realizar el análisis, sin embargo, no se encontraron resultados, pues ninguna base de datos predijo promotor alguno.

Esto llevó a ampliar el rango de búsqueda, así incluyendo la secuencia de nucleótidos del gen *pspF*, río arriba de nuestro gen de interés, junto con otras 100 pb río arriba de éste último gen, suponiendo que el promotor de *qnrB4* pudiera encontrarse más alejado del codón de inicio de la proteína, y no a una posición -10, -35.

En ambas cepas, Bprom predijo 3 posibles promotores para *qnrB4* (**1**: -10 GGCGAAATT/-35 TTGCAA; **2**: -10 CGATATCAT/-35 TTCCCC; **3**: -10 GGGTAAATT/-35 TTACCT) (Figura 15A), dos de ellos (1 y 2) se encontraron dentro de la secuencia del gen *pspF*. El tercero, se encuentra río arriba de *pspF*, haciéndonos suponer que sería el promotor de dicho gen, sin embargo, no se puede descartar que este mismo promotor sea el responsable de la expresión de *qnrB4*, pues ambos genes se codifican en la misma dirección y no están tan alejados uno de otro (Figura 15C).

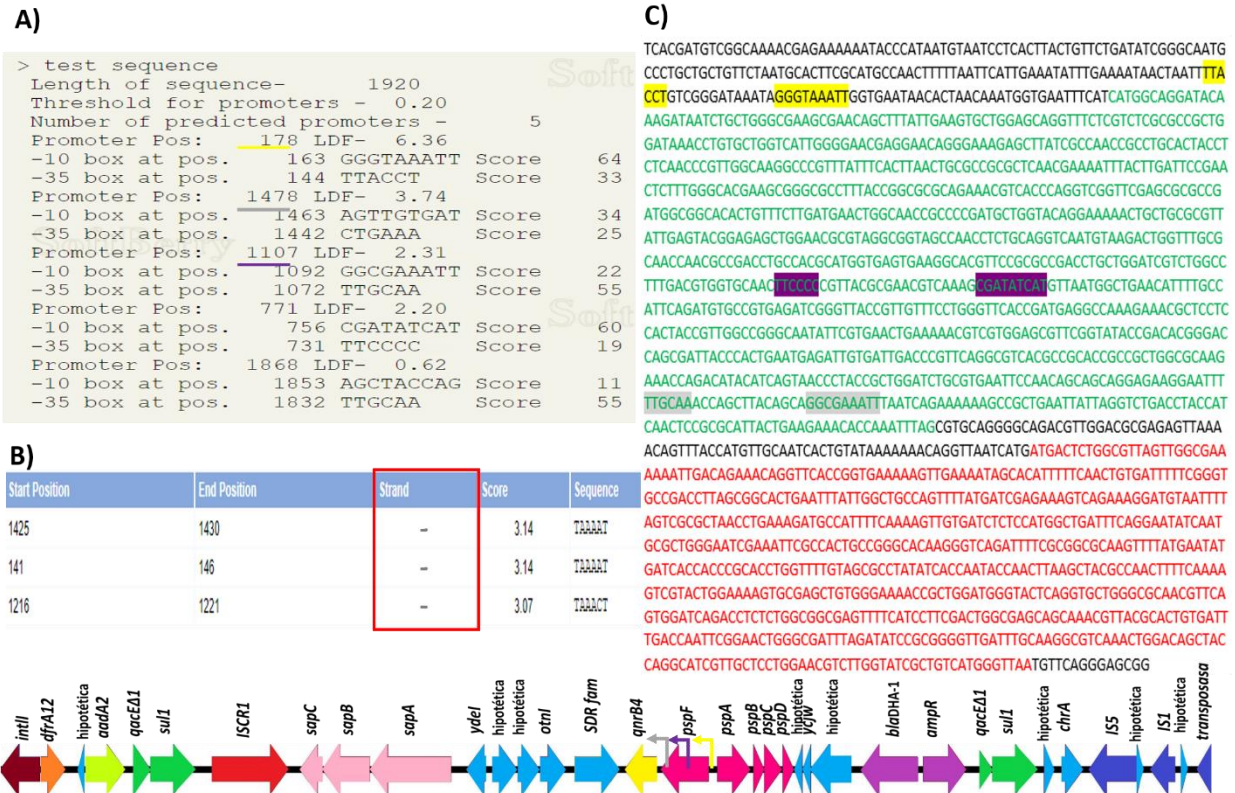


Figura 15. Posibles promotores para *qnrB4*. Cepas Kpn33 y Kpn125. A) Promotores predichos por Bprom: Siendo 3 promotores los posibles para *qnrB4*. B) Promotores predichos por PRODORIC: Las tres predicciones fueron en sentido negativo a nuestra secuencia, no afectando la expresión de *qnrB4*. C) Los promotores fueron señalados dentro de la secuencia de acuerdo a los colores amarillo, gris y morado. Se señala con rojo la secuencia de *qnrB4* y con verde la de *pspF*, el color negro representa secuencias intergénicas.

En el caso de PRODORIC se predijeron 3 posibles promotores, sin embargo, la base de datos los encontró en sentido negativo a las secuencias, por lo que no podrían ser los responsables de iniciar la transcripción de *qnrB4* (Figura 15B). Curiosamente, aunque ambas cepas predicen los mismos promotores, tienen diferentes GER.

Promotores para *qnrB2*.

En CM155, Bprom predijo dos posibles promotores para el gen *qnrB2* (**1**: -10 GTTTACCAT/-35 TTGACG; **2**: -10 GGCTGTAAT/-35 TTGCCC) (Figura 16A). Sin embargo, sería el primero (1) el más probable debido a la localización en la que se encuentra, y en este promotor se observa la presencia de una secuencia de unión al regulador LexA. El segundo está a una distancia considerable y se localiza dentro

de la secuencia que compone el gen *qacΔE1*, dicho gen se encuentra incompleto, al igual que *pspF*, y no existe secuencia intergénica entre ambos genes (Figura 16C).

PRODORIC sólo determinó una predicción en sentido positivo, y esta se localiza en la secuencia intergénica entre *pspF* y *qnrB2*. Aunque no se encuentra a -10 del primer codón (Figura 16B).

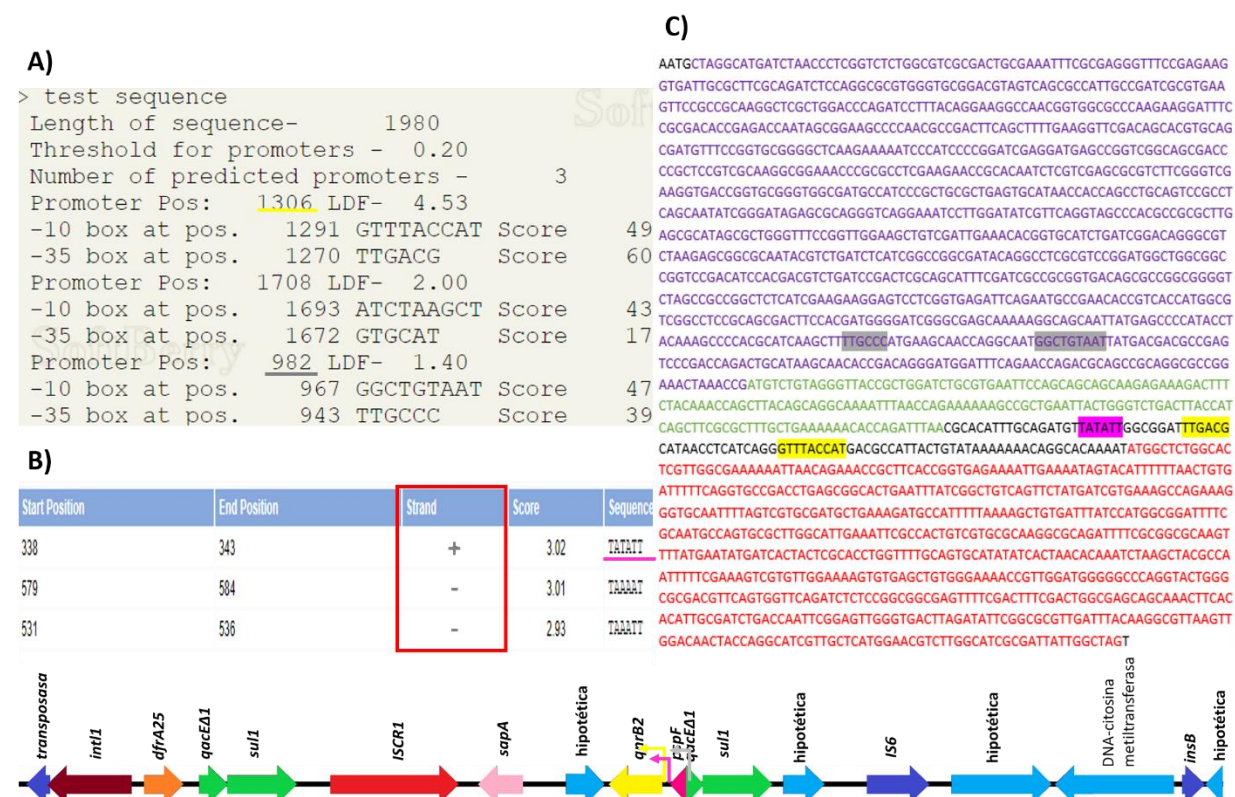


Figura 16. Posibles promotores para *qnrB2*. Cepa CM155. A) Promotores predichos por Bprom: Siendo dos promotores los posibles para *qnrB2*. B) Promotores predichos por PRODORIC: la única predicción en sentido positivo podría ser el promotor de *qnrB2*. C) Los promotores fueron señalados dentro de la secuencia de acuerdo a los colores amarillo, gris (Bprom) y rosa (PRODORIC). Se señala con rojo la secuencia de *qnrB2*, con verde la de *pspF* y morado *qacΔE1*, el color negro representa secuencias intergénicas.

Promotores para *qnrB1*.

En la cepa Kpn47, encontramos 2 predicciones posibles de promotores para *qnrB1* (1: -10 GTTTACCAT/-35 TTGACG; 2: -10 AGATCGGAT/-35 TTGCCA) dadas por Bprom (Figura 16A). Una de ellas (1) se encuentra en una posición adecuada para tratarse del responsable para iniciar la transcripción del gen de interés (Figura 17C).

Igualmente, podemos observar un sitio de unión a LexA, como sucede en *qnrB2* (Figura 17A).

En el caso de PRODORIC no se determinó ningún posible promotor, pues dos predicciones se encuentran en sentido negativo a la secuencia y el único en sentido positivo se localiza dentro de la misma secuencia de *qnrB1* (Figura 17B).



Figura 17. Posibles promotores para *qnrB1*. Cepa Kpn47. A) Promotores predichos por Bprom: Siendo dos promotores los posibles para *qnrB1*. B) Promotores predichos por PRODORIC: Dos predicciones se encuentran en sentido negativo a nuestra secuencia; la única en sentido positivo no es viable al estar dentro de la secuencia de *qnrB1*. C) Los promotores fueron señalados dentro de la secuencia de acuerdo a los colores amarillo y morado. Se señala con rojo la secuencia de *qnrB1* y con verde la de *pspF*, el color negro representa secuencias intergénicas.

9. DISCUSIÓN.

Las infecciones microbianas son la causa líder de mortalidad y morbilidad en países en vías de desarrollo. Esta problemática es difícil de combatir debido a la presencia de un alto índice de resistencia a antibióticos entre los diferentes patógenos que causan estas infecciones. Actualmente, el grupo ESKAPE, al que pertenece *K. pneumoniae*, es considerado un problema de salud pública mundial debido a su alta incidencia causando infecciones dentro de los hospitales, siendo difíciles de manejar (Wyres *et al.*, 2018)

En este estudio se trabajó con 65 cepas de *K. pneumoniae* recuperadas de diferentes instituciones de salud en los estados de Puebla y Ciudad de México. Dichas cepas fueron aisladas de pacientes cursando una IAAS. *K. pneumoniae* es uno de los microorganismos más comunes causando este tipo de infecciones. Tan solo en México, es el segundo agente patógeno más común en causar brotes intrahospitalarios y el tercero en causar IAAS (RHOVE, 2015).

Los aminoglucósidos se encuentran entre los antibióticos más frecuentemente usados para tratar infecciones causadas por Gram-negativos (Nasiri *et al.*, 2018). *K. pneumoniae* ha adquirido mecanismos de resistencia a esta clase de antibióticos mediada por plásmidos, entre los que encontramos enzimas modificadoras de aminoglucósidos, como genes *aac* (acetilasas), *ant* (nucleotidiltransferasas) o *aph* (fosfotrasferasas) o incluso genes de la familia *armA*, que metilan la región 16SARNr (Wang *et al.*, 2020).

El 58.46% (38/65) de las cepas estudiadas presentaron resistencia o susceptibilidad reducida a amikacina (AN). De estas cepas solo 26.15% (17/65) fueron resistentes (Pérez-Sánchez, 2020); sin embargo, el número es elevado en comparación de otros estudios realizados en otros países, como uno en China, con 217 cepas de *K. pneumoniae*, de las que solo <2% fueron resistentes a AN (Keshi *et al.*, 2019). No obstante, en un estudio en México, el porcentaje de resistencia a este antibiótico se incrementa a un 14% de resistencia en un total de 207 cepas (Gallegos-Miranda *et al.*, 2019). Estos resultados concuerdan con los análisis de vigilancia de antibióticos

de la OMS, donde se muestra que en los países en vías de desarrollo se presenta un mayor índice de resistencia a los antibióticos (OMS,2016).

Tampoco podemos olvidar que el 32.3% (21/65) de las cepas presentó susceptibilidad reducida a AN (Pérez-Sánchez, 2020). Es un gran problema que se presente este fenómeno de resistencia, pues la AN es uno de los antibióticos que se propone en combinaciones sinérgicas para combatir infecciones causadas por *K. pneumoniae* MDR, utilizando un tratamiento conjunto de ceftazidima-avibactam con AN (Mikhail *et al.*, 2019). También se ha propuesto combinar fosfomicina con AN para tratar infecciones de *K. pneumoniae* portadoras de carbapenemasas, sin embargo, debido a los altos índices de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) que reportan las cepas hacia AN, los resultados no son favorables (Erturk Sengel *et al.*, 2020).

En contraste a los resultados de AN, la resistencia en las cepas a tobramicina (NN) y gentamicina (GM) es considerablemente mayor, con un 93.84% (61/65) y 87.69% (57/65) respectivamente (Pérez-Sánchez, 2020). En estudios en el continente asiático se observa este mismo fenómeno (Keshi *et al.*, 2019). Se ha demostrado que la resistencia a GM ha aumentado en los últimos años. En Taiwán se observó que hubo un incremento de resistencia a GM, en cepas de *K. pneumoniae*, del 4% al 19% entre el 2014 y el 2016 (Chen *et al.*, 2020). Los porcentajes de resistencia a GM y NN que presentaron las cepas utilizadas en este estudio, también son mayores a los reportados por otro estudio en México, donde con 207 cepas de *K. pneumonie* se reportaron 59% resistentes a NN y 58% a GM (Gallegos-Miranda *et al.*, 2019).

La resistencia a GEN en las cepas que se trabajaron (Pérez-Sánchez, 2020); es mayor a la reportada en otros países (Keshi *et al.*, 2019), donde incluso, en ciertos lugares, como el Reino Unido, la GEN es aún considerada efectiva para el tratamiento de infecciones por *K. pneumoniae* debido a la susceptibilidad presentada al antibiótico (Moradigaravand *et al.*, 2019).

Al realizar la búsqueda de los genes que podrían estar involucrados en la resistencia, se encontraron los genes de resistencia a aminoglucósidos *aac(6')-Ib* y

aac(3)-II en 51/ 63 (80.9%) y 47/63 cepas (74. 6%), respectivamente. Estos datos concuerdan con un estudio en Turquía, donde *aac(6')-Ib* y *aac(3)-IIa* son las EMA más frecuentes en ser detectadas en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* (Cirit *et al.*, 2019). De igual forma, en Irán, un estudio con 130 cepas de *K. pneumoniae*, obtuvo que el 91.5% (119) y el 78.5% (102) presentaban los genes *aac(6')-Ib* y *aac(3)-IIa*, respectivamente (Nasiri *et al.*, 2018).

La AAC(6')-Ib, probablemente es la EMA clínicamente más relevante y es responsable de la resistencia a AN, principalmente, aunque también se ha visto que algunas variantes son capaces de inactivar otros aminoglucósidos, como gentamicina (Ramirez y Tolmasky, 2010). En este estudio, se observó que 24 cepas de las 51 positivas a *aac(6')-Ib* presentaban un fenotipo de susceptibilidad a AN, este fenómeno podría explicarse si el gen no estuviera siendo transcrito debido a factores en su entorno genético, o a que la proteína no es funcional, sin embargo serían necesarios más experimentos para poder comprobarlo.

Por otro lado, AAC(3)-II confiere resistencia a GM y NN, junto con otros aminoglucósidos como netilmicina, sisomicina, 6'-N-etilnetilmicina, dibekacina o 2'-N-etilnetilmicina (Ramirez y Tolmasky, 2010). Todas las cepas positivas al gen que codifica para esta proteína en el estudio presentaron resistencia a NN y GM.

Sin embargo, se obtuvieron 9 cepas con resistencia a AN pero negativas a *aac(6')-Ib* mientras que 10 cepas fueron negativas a *aac(3)-II*, a pesar de tener resistencia a GM y NN. Aún así, no podemos olvidar la participación de otros mecanismos de resistencia a aminoglucósidos que podrían estar contribuyendo al fenómeno de resistencia, como EMA de otras clases reportadas en *K. pneumoniae*, del tipo fosfotransferasa, como *aph(3')-IIIa*, o del tipo nucleotidiltransferasa, como *ant(4)-Ia* (Nasiri *et al.*, 2018). También mutaciones en la subunidad 16S en los ribosomas bacterianos podrían contribuir al fenómeno de resistencia a esta familia de antibióticos; o en el caso de las cepas con resistencia a NN y GM sin el gen *aac(3)-II*, podrían estar portando diferentes variantes de *aac(6')-Ib* que contribuyen a la resistencia a estos antibióticos, como la variante *aac(6')-Ib₁₁*, que confiere resistencia a GM (Ramirez y Tolmasky, 2010; Navon-Venezia *et al.*, 2017).

Por otro lado, los determinantes de RQMP son considerados un factor clave en mediar la resistencia a fluoroquinolonas, no sólo en *K. pneumoniae*, sino también en otras especies de Enterobacterias. Dentro de estos determinantes encontramos a los genes que codifican para unas proteínas que protegen a los blancos farmacológicos de la unión a quinolonas, conocidos como *qnr* (Wang *et al.*, 2020).

De las 65 cepas iniciales, el 84.61% (55/65) mostró resistencia o susceptibilidad reducida a la familia de las quinolonas. Específicamente, el 64.51% (42 cepas) a LVX, el 81.53% (53 cepas) a NOR, y el 84.61% (55 cepas) a CIP y NA. La resistencia a ciprofloxacino es similar a la reportada en un estudio en México donde Gallegos-Miranda *et al.*, reportó que el 88% (N=207) de las cepas fue resistente a esta fluoroquinolona (Gallegos-Miranda *et al.*, 2019).

Debido a la resistencia encontrada, se buscaron los determinantes de RQMP *qnrA* y *qnrB*, en 55 cepas. Ninguna cepa fue positiva al gen *qnrA*. No obstante, en el 90.9% (50/55 cepas) se encontró el gen *qnrB*. En Latinoamérica, *qnrB* es el segundo gen más reportado para RQMP en Enterobacterias (Vieira *et al.*, 2020). En diferentes estudios se ha reportado a *qnrS* como la variante de los genes *qnr* más reportada en *K. pneumoniae*, o se reporta en conjunto con *qnrB*, incluso en cepas hipervirulentas (Khairy *et al.*, 2020; Gallegos-Miranda *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019) por eso, la búsqueda de *qnrS* también podría ser ensayada en un futuro.

Cinco cepas en este estudio mostraron resistencia o susceptibilidad reducida a las quinolonas utilizadas, pero no presentaron ninguno de los determinantes de RQMP buscados. Sin embargo, 4 de estas cepas mostraron resistencia conjunta a aminoglucósidos y quinolonas, siendo positivas al gen *aac(6')-Ib*, por lo que se podría estar tratando de la variante *aac(6')-Ib-cr*, que contribuye a la resistencia a CIP. Es necesario en posteriores estudios manda a secuenciar los genes para determinar si se trata de esta variante. No se puede descartar esta posibilidad, ya que, se ha observado a *aac(6')-Ib-cr* como el determinante de RQMP más reportado en Enterobacterias en Latinoamérica (Vieira *et al.*, 2020), incluyendo a México (Gallegos-Miranda *et al.*, 2019).

Hablando de los entornos genético, existen pocos estudios de epidemiología molecular enfocados en los mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas en *K. pneumoniae* (Nagasaka, 2015). Por otro lado, debido a la contingencia sanitaria vivida en todo el mundo y al paro de actividades presenciales en la universidad, se procedió a hacer el estudio bioinformático de secuencias genéticas de cepas de *K. pneumoniae*. De las secuencias estudiadas, cuatro habían sido descritas en un proyecto de Domokos y colaboradores, reportando determinantes de RQMP y de resistencia a aminoglucósidos. Adicionalmente, analizaron la expresión de los genes *qnr*. Dichas secuencias fueron obtenidas de la base de datos ENA.

También se trabajó con dos secuencias de *K. pneumoniae*, una portadora del gen *qnrB2* y otra del gen *aac(6')-Ib-cr*, donadas por la D.C. Ma. Elena López Bello. Por último, se obtuvieron dos secuencias de plásmidos aislados de *K. pneumoniae* de la base de datos del NCBI, uno portaba el gen *qnrB1* y otro el gen *qnrB2*. Se trabajó con todas estas secuencias para observar y comparar los entornos genéticos que rodeaban a las diferentes variantes de los genes *qnr*, así como de los genes *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-II* y *aac(6')-Ib*, con la intención de encontrar los elementos genéticos movilizables involucrados en la diseminación de estos determinantes de resistencia. También, se hizo la búsqueda de los posibles promotores de los genes *qnr* de las secuencias que los portaban, para observar si la expresión relativa podía verse influenciada por los posibles promotores que se encontraran.

La capacidad de las bacterias para adquirir y diseminar resistencia a antibióticos por medio de transferencia horizontal de genes, en estructuras como transposones, integrones o plásmidos, contribuye en el incremento de los fenotipos de MDR (Kaushik *et al.*, 2018).

Un integrón es un elemento genético bacteriano compuesto de regiones conservadas: 5'-RC y 3'-RC; así como regiones variables compuestas por casetes de genes de diferentes tipos, siendo los más relevantes, genes que codifican para mecanismos de resistencia a antibióticos. Se han descrito 5 clases de integrones, pero las clases 1, 2 y 3 son conocidos como integrones de multidrogoresistencia,

relevantes en la resistencia a antibióticos en el grupo de las Enterobacterias (Rui *et al.*, 2018; Kaushik *et al.*, 2018; Márquez *et al.*, 2008).

En la estructura convencional de un integrón clase 1 encontramos que la 5'-RC está compuesta por un gen *intl1* que codifica para una integrasa y sitios de recombinación *attI*, mientras que 3'-RC contiene los genes *qacΔE1* y *sul1* (Roy *et al.*, 2011). Por otro lado, las secuencias de inserción que contienen regiones comunes 1 (ISCR1) son elementos genéticos similares a IS91 que movilizan secuencias de ADN adyacentes por medio del mecanismo conocido como replicación de círculos rodantes (Rui *et al.*, 2018; Kaushik *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2012).

La asociación de un integrón Clase 1 con una ISCR1 da lugar a una estructura genética larga conocida como Integrón Clase 1 Complejo o Inusual (IC1C), contando con una repetición de la 3'-RC (Rui *et al.*, 2018). En este estudio, los genes *qnrB4* (Kpn33 y Kpn125) y *qnrB2* (CM155 y el plásmido pJIE137) están dentro de un IC1C.

En las secuencias de Kpn33 y Kpn125, en el casete de genes después de ISCR1 del IC1C, encontramos a *qnrB4* flanqueado por los operones *sap* y *psp*, asociados río abajo con el gen *bla_{DHA-1}*, que codifica para una betalactamasa del tipo AmpC. Se han descrito estructuras similares a la encontrada en este trabajo en otros plásmidos de *K. pneumoniae* en países como Francia (plásmido pNMDHA, GenBank: GU943791.1; Guo *et al.*, 2016: plásmido pKPS30: KF793937.1) o regiones asiáticas (plásmido pM16-13, GenBank: KY751925.1) (Anexo 6). Esta tendencia, también se ha observado en secuencias río abajo de ISCR1 en enterobacterias como *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* en Brasil (Carvalho-Assef *et al.*, 2014: GenBank: KF646592.1). En otros trabajos, también se han reportado los mismos genes en una posición invertida, de forma que se encuentran como: ISCR1, 3'-RC, *bla_{DHA-1}-ampR*, el operon *psp* y *qnrB4*, pero faltando el operon *sap*. Esta estructura forma un clúster conocido como *armA-bla_{DHA-1}-qnrB4*, posible resultado de la transposición por círculos rodantes de ISCR1, siendo observado en

plásmidos aislados en EUA y China (Guo *et al.*, 2016: plásmido pYDC67, GenBank: KT225462.1).

En cuanto a la región variable entre *intl1* y la primera 3'-RC, en las cepas Kpn33 y Kpn125, encontramos los genes *dfrA12* y *aadA2*, que se han reportado en Integrones Clase 1 en *K. pneumoniae* (GenBank: HM569734.1), *E. coli* (GenBank: JN108892.1) e incluso en otras bacterias como *Vibrio cholerae* (Thungapathra *et al.*, 2002).

Sin embargo, la estructura completa del IC1C encontradas en este trabajo, en las cepas Kpn33 y Kpn125, no se había descrito en ninguna bacteria. Hasta el momento no se había asociado a la variante *qnrB4* con *dfrA12* y *aadA2* dentro de un IC1C. Solo en bacterias como *Proteus mirabilis*, se ha observado a *dfrA12* y *aadA2* dentro de un IC1C, pero asociados a *qnrA1* (GenBank: MT585156.1, GQ891753.1).

En la cepa CM155 y el plásmido PJIE137 (portadores de *qnrB2*) la región variable después de ISCR1 es idéntica entre ambas secuencias: el operón *sap* se encuentra incompleto con solo una parte de *sapA*, el operon *psp* tampoco se haya presente y sólo se observa parte de la secuencia de *pspF* cortando el gen *qacΔE1* de la segunda 3'-RC. Esta misma estructura se describe en otras secuencias de *K. pneumoniae* aisladas en Corea (GenBank: CP052289.1), Australia (GenBank: AJ609296.3), EUA (GenBank: JX193301.1) y Taiwán (GenBank FJ943244.1).

Sin embargo, la región variable entre *intl1* y la primera 3'-RC es diferente. En pJIE137 encontramos *dfrA12* y *aadA2*, siendo el primer reporte de estos genes asociados con *qnrB2*. En CM155, se reporta *dfrA25*. Toda la estructura del IC1C en CM155 se ha reportado en otras Enterobacterias como *E. coli* (GenBank: CP081648.1) *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar *Thiphymurium* (GenBank: MN241904.1), *Citrobacter farmeri* (GenBank: CP081316.1) y *K. michiganensis* (GenBank: CP081352.1), al igual que en otras Gram-negativas como *P. mirabilis* (GenBank: KJ186154.1).

Por otra parte, los Transposones (Tn), son elementos de ADN que pueden moverse de un sitio de una molécula de ADN a otro, o incluso a otra molécula de ADN

diferente. Existen 4 categorías dentro de los transposones bacterianos: Secuencias de inserción, Transposones compuestos, Transposones no compuestos y el fago Mu transponible (Babakhani y Oloomi, 2018). De estos, las secuencias de inserción son los elementos genéticos móviles autónomos más simples en el genoma bacteriano (He *et al.*, 2015). Una secuencia de inserción recurrente en los entornos observados en este trabajo es IS26, que juega un papel importante en la evolución de la resistencia a antibióticos en los Gram-negativos (Pong *et al.*, 2021).

En los entornos descritos alrededor de *qnrB1*, en Kpn47 y el plásmido pRIVM_C014906_2 encontramos a los genes rodeados de secuencias de inserción y transposones. Lo mismo sucede en los entornos de los genes *aac(6')-Ib*, *aac(3)-II* y *aac(6')-Ib-cr*. Sin embargo, *aac(6')-Ib-cr* también se ha observado en *K. pneumoniae* en estructuras como integrones (GenBank: KJ511462.1) o IC1C asociados a *qnrB6* (GenBank: EF636461.1). El gen *aac(6')-Ib*, por su parte, se ha descrito en IC1C (GenBank: MW266061.1) o en transposones como Tn1331 (GenBank: M55547.1).

Por otra parte, los plásmidos portadores de genes de resistencia, también juegan un papel importante en el origen de la adquisición de estos determinantes en bacteria patogénicas, tanto de la comunidad como hospitalarias, siendo estas estructuras ADN extracromosomal capaces de ser transferidos de forma horizontal (Caratolli *et al.*, 2013).

Originalmente, la resistencia a quinolonas se atribuía a mutaciones cromosomales en los genes de las topoisomerasas bacterianas y/o a la regulación en la expresión de bombas de eflujo (Park, 2006). Pero en 1998, se describió el plásmido pGM252, con un locus de resistencia a quinolonas, que fue designado como *qnr*, que resultaría ser un gen codificante para una proteína que adoptaría ese nombre (Martínez-Martínez *et al.*, 1998).

El grupo IncF es uno de los tipos más frecuentes de plásmidos, jugando un papel importante en la diseminación de genes de resistencia y virulencia en las enterobacterias (Dolejska *et al.*, 2013). Este grupo fue identificado en 4 de los plásmidos circulares y completos de *K. pneumoniae* reportados en el NCBI.

Adicionalmente, esta familia ha sido descrita diseminando otros genes de resistencia a otras familias de antibióticos, como aminoglucósidos y betalactámicos, como el gen *bla*_{CTX-M} (Kaplan *et al.*, 2015).

Los plásmidos del grupo IncR, han sido descritos recientemente y alrededor del mundo, principalmente en enterobacterias, portando múltiples genes de resistencia (Guo *et al.*, 2016), siendo reportados como contenedores principales de *bla*_{CTX-M-15} entre cepas de *K. pneumoniae* (Hennequin *et al.*, 2018), microorganismo en el cual se ha diseminado especialmente bien, en cepas pertenecientes a los ST258 y ST11, a este último grupo pertenecen las cepas Kpn33 y Kpn125 (Guo *et al.*, 2016; Domokos *et al.*, 2019). Este grupo podría asociarse a la diseminación de la variante *qnrB4* (Guo *et al.*, 2016; Hennequin *et al.*, 2018; Domokos *et al.*, 2019), aunque dicha variante también se ha reportado en plásmidos del tipo IncL/M.

El grupo IncL/M es conformado por plásmidos conjugativos de amplio rango de hospederos identificados en Enterobacterias clínicamente relevantes y se han identificado como portadores de genes BLEEs (Adamczuk *et al.*, 2015). No solo se ha encontrado en la especie *K. pneumoniae*, sino también en otras especies de este género como *K. varicola* (Hennequin *et al.*, 2018).

El grupo IncHI1B-like se considera una nueva variante de la familia IncH, y fue descrito por primera vez en un plásmido aislado de *K. pneumoniae* en Marruecos (Villa *et al.*, 2012). Esta familia se ha observado portando genes de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos y quinolonas, como los determinantes de RQMP *qnrB1* y *aac(6')-Ib-cr* (Villa *et al.*, 2012; Sakamoto *et al.*, 2018; Doi *et al.*, 2014).

Con respecto a la búsqueda de posibles promotores, hay poca información sobre la expresión y regulación de los genes *qnr* (Da Re *et al.*, 2009). En este estudio determinamos la presencia de posibles promotores para los genes *qnrB1*, *qnrB2* y *qnrB4* por métodos *in silico*.

Tanto en la secuencia de *qnrB1* (CM155), como en la de *qnrB2* (Kpn47), los promotores encontrados con mayor probabilidad de ser los correctos fueron Caja-10: GTTTACCAT/Caja-35: TTGACG. Dichos resultados concuerdan con los

reportados en otros trabajos en los que se determinaron los promotores por métodos experimentales para *qnrB2* (Da Re *et al.*, 2009) o por métodos *in silico* para *qnrB1* (Briales *et al.*, 2012).

Cabe recalcar que en estas variantes, *qnrB1* y *qnrB2*, se ha reportado una relación entre su expresión y la activación del mecanismo de respuesta SOS. Lo anterior, debido a que se encuentran sitios de unión a LexA, que se considera como el regulador central de dicha respuesta activada por el daño al ADN (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2016). En los resultados obtenidos por Bprom, también se describieron los sitios de unión a LexA en la secuencia intergénica entre la caja -10 del promotor y el primer codón de los genes *qnrB1* y *qnrB2*, concordando con lo obtenido en otros trabajos (Anexo 5) (Da Re *et al.*, 2009; Briales *et al.*, 2012).

Por otro lado, en las secuencias estudiadas portadoras de *qnrB4* (Kpn33 y Kpn125) no se observa el mismo fenómeno. En ninguna de las plataformas utilizadas se encontraron posibles promotores para los genes *qnrB4*. Sin embargo, al observar la presencia del gen *pspF* cercano a nuestro gen de interés, y al hecho de que sí se encontró el promotor de *pspF*, proponemos que este pudiera ser el encargado de influir en la expresión de *qnrB4*.

En general, el operón *psp* codifica para el sistema de proteínas de shock por fagos, un sistema que funciona como respuesta ante el estrés extracitoplásmico, siendo activado ante temperaturas extremas, localización errónea de proteínas de envoltura, concentración osmótica o de etanol, e incluso a la presencia de iones como cianuro de carbonilo m-clorofenilhidrazona (Flores-Kim *et al.*, 2016, Darwin, 2005).

PspF es un activador de la RNA polimerasa con σ^{54} , encargado de la regulación de la transcripción del operón *psp*; pertenece a la familia de activadores de proteínas potenciadoras de unión a ADN y se transcribe divergentemente al operon *psp*, utilizando un promotor para unión a una RNA polimerasa con σ^{70} (Jovanovic *et al.*, 1996; Jovanovic *et al.*, 1997). El promotor *pspF* se encuentra en la misma dirección que el gen *qnrB4*, y la lejanía entre ambos genes no es grande, ya que son adyacentes.

Domokos y colaboradores describieron a las cepas Kpn33 y Kpn125, portadoras de *qnrB4*, como las cepas con mayor expresión de los genes *qnr*. Un promotor fuerte puede ser responsable de una expresión elevada de los genes, como sucede en el caso de los promotores de *qnrA* (Jacoby *et al.*, 2014). Por otro lado, también se ha observado que un promotor altamente eficiente, como el que se encuentra para el gen *int1* de un Integrón clase 1, puede regular la expresión de los genes dentro de los casetes capturados dentro de la estructura del mismo integrón, siendo la proximidad de los casetes al promotor un importante factor que influye en el grado de expresión de los genes: se obtiene un nivel alto de expresión si los genes de los casetes están más cerca del promotor (Kaushik *et al.*, 2018).

Hasta el momento, se ha observado en otras secuencias que el gen *qnrB4* va acompañado por *pspF* (GenBank: GU943791.1, KF646592.1, KY751925.1, KF793937.1, KT225462.1). Si el promotor de *pspF* funciona como uno de alta eficiencia, podría estar influyendo en la expresión de *qnrB4*. Sin embargo, más estudios serían necesarios para comprobar esto, y determinar porque existen diferencias en los niveles de expresión, debido a que otros elementos de la región reguladora pueden estar influyendo en la expresión de los genes.

10. Conclusiones.

En este estudio se mostró la presencia de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a aminoglucósidos y/o quinolonas portadoras de genes *aac(6')-Ib* o *aac(3)-II*, y *qnrB* causantes de IAAS en diferentes instituciones de salud pública en México.

El análisis bioinformático mostró la participación de transposones/secuencias de inserción en la diseminación de variantes *qnrB1*, y por otro lado, se observó la participación de estructuras más grandes, como Integrones Clase 1 Complejos siendo acarreadores de las variantes *qnrB2* y *qnrB4*.

Se observaron nuevos arreglos de genes como la asociación de *qnrB4* con *dfrA12* y *aadA2*, dentro de un IC1C, en cepas de *K. pneumoniae*.

Se observó la participación de plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad en la diseminación de los determinantes *qnrB*, entre los que encontramos IncF, IncR, IncL/M e IncHI1B-like.

En el análisis de promotores, para *qnrB2* y *qnrB1* se encontraron posibles promotores σ^{70} y secuencias de unión a LexA, que se asocian con la respuesta SOS al estrés.

Para *qnrB4*, no se encontraron posibles promotores cercanos; sin embargo, dada la cercanía el promotor descrito para *pspF* podría ser el responsable de influir en su expresión.

11. Perspectivas.

- Determinar por secuenciación la presencia de *aac(6')-Ib-cr* en las cepas de estudio del laboratorio.
- Investigar la participación en la resistencia a aminoglucosidos de otras enzimas modificadoras, o las mutaciones en la región 16S de la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos.
- Determinar la presencia del gen *qnrS* en la cepas del estudio.
- Buscar otros determinantes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, como *qepA*, *oqxA* y *oqxB*.
- Realizar estudios experimentales de los posibles promotores para los diferentes *qnrB*.

12. BIBLIOGRAFÍA.

- Adamczuk M, Zaleski P, Dziewit L, Wolinowska R, Nieckarz M, Wawrzyniak P, Kieryl P, Plucienniczak A, Bartosik D. Diversity and Global Distribution of IncL/M Plasmids Enabling Horizontal Dissemination of β -Lactam Resistance Genes among the Enterobacteriaceae. *Biomed Res Int*. 2015;2015:414681. doi: 10.1155/2015/414681.
- Alcantar-Curiel, M.D. y Giron, J.A. Klebsiella pneumoniae and the pyogenic liver abscess: implications and association of the presence of rpmA genes and expression of hypermucoviscosity. *Virulence*. 2015; 6 (5): 407-409
- Alós, J.I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2015;33(10):692–699
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Andam CP, Fournier GP, Gogarten JP. Multilevel populations and the evolution of antibiotic resistance through horizontal gene transfer. *FEMS Microbiol Rev*. 2011 Sep;35(5):756-67. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00274.x.
- Babakhani S, Oloomi M. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol*. 2018;58(11):905-917. doi: 10.1002/jobm.201800204.
- Briales A, Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, Machuca J, Díaz de Alba P, Blazquez J, Pascual A. Exposure to diverse antimicrobials induces the expression of qnrB1, qnrD and smaqr genes by SOS-dependent regulation. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(12):2854-9. doi: 10.1093/jac/dks326.
- Briales A., Rodríguez-Martínez JM, Velasco C, Díaz de Alba P, Rodríguez-Baño J, Martínez-Martínez L y Pascual A. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac(6)-Ib-cr in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2012; 39: 431– 434
- Brisse S y Verhoef J. Phylogenetic diversity of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001; 51: 915–924.
- Brisse S, Passet V, Grimont PAD. Description of Klebsiella quasipneumoniae sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae subsp. nov. and Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae subsp. nov., and demonstration that Klebsiella singaporensis is a junior heterotypic synonym of Klebsiella variicola. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64(9):3146-3152.

- Broberg CA, Palacios M y Miller VL. Klebsiella: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Reports*. 2014; 6 (64)
- Calfee DP. Recent advances in the understanding and management of Klebsiella pneumoniae. *F1000Research*. 2017.
- Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013;303(6-7):298-304. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001.
- Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Tavares CP, Chagas TP, Marques EA, Timm LN, Da Silva RC, Falci DR, Asensi MD. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing Enterobacter hormaechei isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(4):2475-6. doi: 10.1128/AAC.02804-13..
- Catalán-Nájera JC, Garza-Ramos U. y Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary Klebsiella spp. phenotypes?. *VIRULENCE*. 2017; 8(7): 1111–1123.
- Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007; 60(2): 394–397.
- Cerceo E, Deitelzweig SB, Sherman BM, Amin AN. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospital Setting: Overview, Implications for Clinical Practice, and Emerging Treatment Options. *Microb Drug Resist*. 2016;22(5):412-31. doi: 10.1089/mdr.2015.0220.
- Chen CL, Hou PC, Wang YT, Lee HY, Zhou YL, Wu TS, Janapatla RP, Yang CC. The High mortality and antimicrobial resistance of Klebsiella pneumoniae bacteremia in northern Taiwan. *J Infect Dev Ctries*. 2020; 14(4):373-379. doi: 10.3855/jidc.11524.
- Cheng VC, Yam WC, Tsang LL, Yau MC, Siu GK, Wong SC, Chan JF, To KK, Tse H, Hung IF, Tai JW, Ho PL, Yuen KY. Epidemiology of Klebsiella oxytoca-associated diarrhea detected by Simmons citrate agar supplemented with inositol, tryptophan, and bile salts. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(5):1571-9.
- Choby JE, Howard-Anderson J y Weiss DS. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae - clinical and molecular perspectives. *J Intern Med*. 2019; doi: 10.1111/joim.13007
- Cirit OS, Fernández-Martínez M, Yayla B, Martínez-Martínez L. Aminoglycoside resistance determinants in multiresistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates from Turkish and Syrian patients. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2019; 66(3):327-335. doi: 10.1556/030.66.2019.005.

- Compain F, Frangeul L, Drieux L, Verdet C, Brisse S, Arlet G, Decré D. Complete nucleotide sequence of two multidrug-resistant IncR plasmids from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jul;58(7):4207-10. doi: 10.1128/AAC.02773-13.
- Conlan S, Thomas PJ, Deming C, Park M, Lau AF, Dekker JP, Snitkin ES, Clark TA, Luong K, Song Y, Tsai YC, Boitano M, Dayal J, Brooks SY, Schmidt B, Young AC, Thomas JW, Bouffard GG, Blakesley RW; NISC Comparative Sequencing Program, Mullikin JC, Korlach J, Henderson DK, Frank KM, Palmore TN, Segre JA. Single-molecule sequencing to track plasmid diversity of hospital-associated carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Sci Transl Med*. 2014 Sep 17;6(254):254ra126. doi: 10.1126/scitranslmed.3009845.
- Da Re S, Garnier F, Guérin E, Campoy S, Denis F, Ploy MC. The SOS response promotes qnrB quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Rep*. 2009;10(8):929-33. doi: 10.1038/embor.2009.99.
- Darwin AJ. The phage-shock-protein response. *Mol Microbiol*. 2005;57(3):621-8. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04694.x..
- Díaz P, Bello H, Domínguez M, Trabal N, Mella S, Zemelman R, y González G. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido. *Rev Méd Chile* 2004; 132: 1173-1178
- Doi Y, Hazen TH, Boitano M, Tsai YC, Clark TA, Korlach J, Rasko DA. Whole-genome assembly of *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and OXA-232 carbapenemases using single-molecule, real-time sequencing. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(10):5947-53. doi: 10.1128/AAC.03180-14..
- Dolejska M, Villa L, Dobiasova H, Fortini D, Feudi C, Carattoli A. Plasmid content of a clinically relevant *Klebsiella pneumoniae* clone from the Czech Republic producing CTX-M-15 and QnrB1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013. 57(2):1073-6. doi: 10.1128/AAC.01886-12.
- Domokos J, Damjanova I, Kristof K, Ligeti B, Kocsis B, y Szabo D. Multiple Benefits of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in *Klebsiella pneumoniae* ST11 High-Risk Clone and Recently Emerging ST307 Clone. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10(157)
- Erturk Sengel B, Altinkanat Gelmez G, Soyletir G, & Korten V. In vitro synergistic activity of fosfomicin in combination with meropenem, amikacin and colistin against OXA-48 and/or NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Chemotherapy*. 2020; 32(5), 237–243. doi:10.1080/1120009x.2020.1745501
- Fariña, N. Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*.

2016; 14(1), 04-05. [https://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(01\)04-005](https://dx.doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(01)04-005)

Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017 2;57(13):2857-2876. doi: 10.1080/10408398.2015.1077192.

Flores-Kim J, Darwin AJ. The Phage Shock Protein Response. *Annu Rev Microbiol*. 2016;70:83-101. doi: 10.1146/annurev-micro-102215-095359.

Gallegos-Miranda V, Garza-Ramos U, Bolado-Martínez E, Navarro-Navarro M, Félix-Murray KR, Candia-Plata MDC, Sanchez-Martinez G, Dúran-Bedolla J, Silva-Sánchez J. ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from health-care institutions in Mexico. *J Chemother*. 2021; 33(2):122-127. doi: 10.1080/1120009X.2020.1861815.

Gil-Gil T, Laborda P, Sanz-García F, Hernando-Amado S, Blanco P, & Martínez JL. Antimicrobial resistance: A multifaceted problem with multipronged solutions. *MicrobiologyOpen*. 2019; 8(11), e945. <https://doi.org/10.1002/mbo3.945>

Guo Q, Spychala CN, McElheny CL, Doi Y, Comparative analysis of an IncR plasmid carrying *armA*, *blaDHA-1* and *qnrB4* from *Klebsiella pneumoniae* ST37 isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 79(4): 882–886, <https://doi.org/10.1093/jac/dkv444>

He S, Hickman AB, Varani AM, Siguier P, Chandler M, Dekker JP, Dyda F. Insertion Sequence IS26 Reorganizes Plasmids in Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria by Replicative Transposition. *mBio*. 2015; 6(3):e00762. doi: 10.1128/mBio.00762-15.

Hendrickx APA, Landman F, de Haan A, Borst D, Witteveen S, van Santen-Verheuvél MG, van der Heide HGJ, Schouls LM; Dutch CPE surveillance Study Group. Plasmid diversity among genetically related *Klebsiella pneumoniae* blaKPC-2 and blaKPC-3 isolates collected in the Dutch national surveillance. *Sci Rep*. 2020 Oct 8;10(1):16778. doi: 10.1038/s41598-020-73440-2.

Hennequin C, Chlilek A, Beyrouthy R, Bonnet R, Robin F. Diversity of DHA-1 encoding plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 16 French hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2018; 73: 2981–2989.

Hsu V. Prevention of health care-associated infections. *Am Fam Physician*. 2014 Sep 15;90(6):377-82. Erratum in: *Am Fam Physician*. 2015; 91(10):676. PMID: 25251230.

Huang TW, Chen TL, Chen YT, Lauderdale TL, Liao TL, Lee YT, Chen CP, Liu YM, Lin AC, Chang YH, Wu KM, Kirby R, Lai JF, Tan MC, Siu LK, Chang CM, Fung

- CP, Tsai SF. Copy Number Change of the NDM-1 sequence in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate. *PLoS One*. 2013 ;8(4):e62774. doi: 10.1371/journal.pone.0062774.
- Izadi N, Naderi-Nasab M, Harifi-Mood E y Meshkat Z. The Frequency of qnr Genes in Extended-Spectrum β -lactamases and non-ESBLs *Klebsiella pneumoniae* Species Isolated from Patients in Mashhad, Iran. *Iran J Pathol*. 2017; 12(4): 377-383
- Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr*. 2014;2(5):10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013.
- Jovanovic G, Dworkin J, Model P. Autogenous control of PspF, a constitutively active enhancer-binding protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1997;179(16):5232-7. doi: 10.1128/jb.179.16.5232-5237.1997.
- Jovanovic G, Weiner L, Model P. Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J Bacteriol*. 1996;178(7):1936–1945.
- Kaplan E, Sela N, Doron-Faigenboim A, Navon-Venezia S, Jurkevitch E, Cytryn E. Genomic and Functional Characterization of qnr-Encoding Plasmids from Municipal Wastewater Biosolid *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Front Microbiol*. 2015; 8;6:1354. doi: 10.3389/fmicb.2015.01354.
- Kaur Cp, Vadivelu J & Chandramathi S. Impact of *Klebsiella pneumoniae* in lower gastrointestinal tract diseases. *Journal of Digestive Diseases*. 2018; 19: 262–271
- Kaushik M, Kumar S, Kapoor RK, Virdi JS, Gulati P. Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 51(2):167-176. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004..
- Keshi L, Weiwei X, Shoulin L, *et al.*. Analysis of drug resistance of extended-spectrum beta-lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children with urinary tract infection. *Saudi Med J*. 2019;40(11):1111-1115. doi:10.15537/smj.2019.11.24547
- Khairy RMM, Mahmoud MS, Shady RR, Esmail MAM. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital-acquired infections: Concomitant analysis of antimicrobial resistant strains. *Int J Clin Pract*. 2020; 74(4):e13463. doi: 10.1111/ijcp.13463.
- Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC y Lee SH. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*:

- Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017; 7(483)
- Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z & Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol*. 2014; 9(9):1071–1081
- Liu Y, Du FL, Xiang TX, Wan LG, Wei DD, Cao XW, Zhang W. High Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants Among Serotype K1 Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Isolates in China. *Microb Drug Resist*. 2019; 25(5):681-689. doi: 10.1089/mdr.2018.0173.
- Long SW, Olsen RJ, Eagar TN, Beres SB, Zhao P, Davis JJ, Brettin T, Xia F, Musser JM. Population Genomic Analysis of 1,777 Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates, Houston, Texas: Unexpected Abundance of Clonal Group 307. *mBio*. 2017 May 16;8(3):e00489-17. doi: 10.1128/mBio.00489-17.
- Márquez C, Labbate M, Raymondo C, Fernández J, Gestal AM, Holley M, Borthagaray G, Stokes HW. Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(10):3417-25. doi: 10.1128/JCM.00835-08.
- Martin RM, y Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018; 8(4).
- Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. 1998. 14;351(9105):797-9.
- Martínez-Romero E, Rodríguez-Medina N, Beltrán-Rojel M, Silva-Sánchez J, Barrios-Camacho H, Pérez-Rueda E, Garza-Ramos U. Genome misclassification of *Klebsiella variicola* and *Klebsiella quasipneumoniae* isolated from plants, animals and humans. *Salud Publica Mex*. 2018; 60:56-62.
- McEwen SA, Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr*. 2018; 6(2). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.
- Mella-M S, Sepúlveda-A M, González-R G, Bello-T H, Domínguez-Y M, Zemelman -Z R, & Ramírez-G C. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista chilena de infectología*. 2004;21(4), 330-338. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182004000400007>
- Merla C, Rodrigues C, Passet V, Corbella M, Thorpe HA, Kallonen TVS, Zong Z, Marone P, Bandi C, Sasser D, Corander J, Feil EJ, Brisse S. Description of

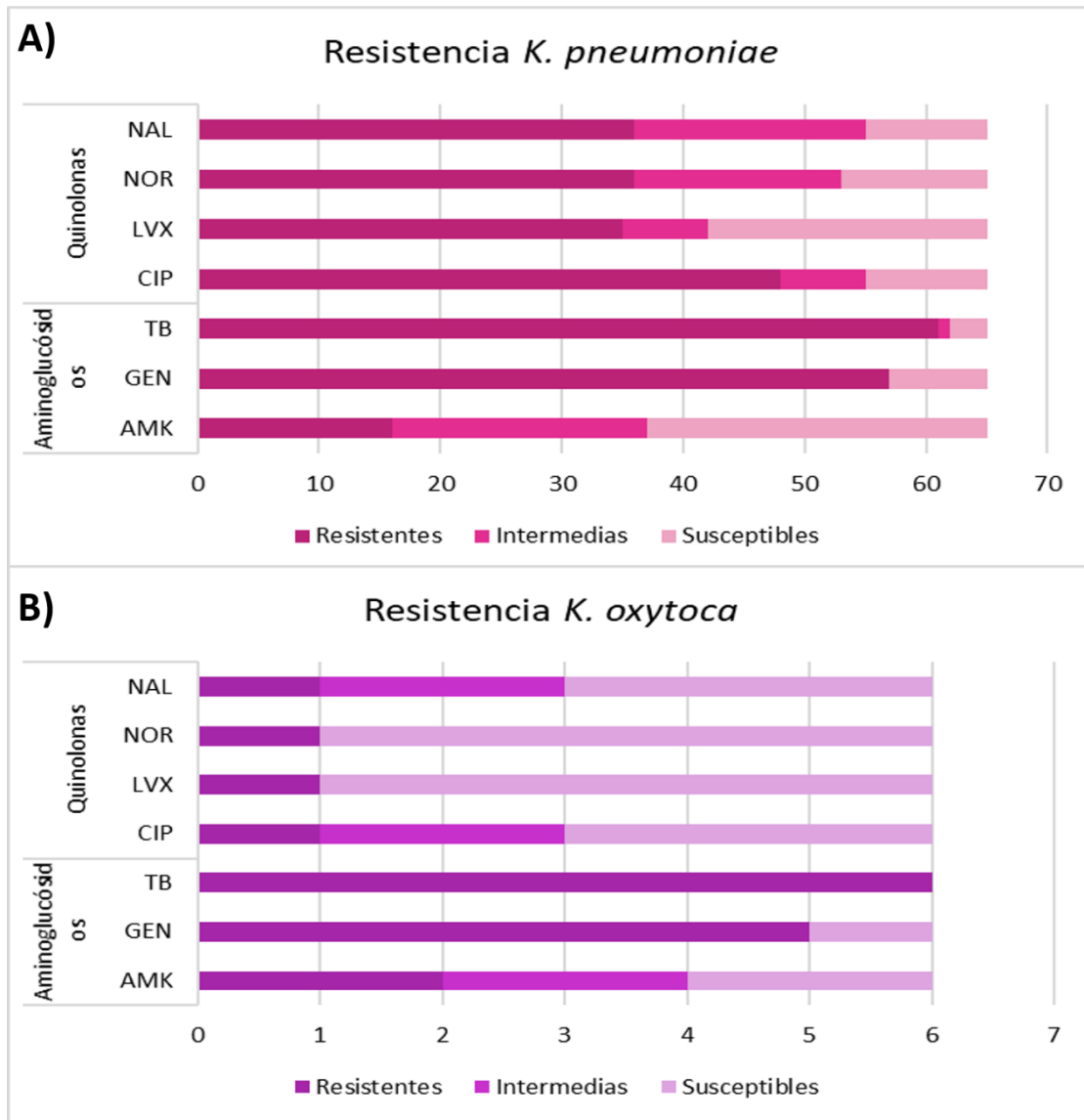
- Klebsiella spallanzanii* sp. nov. and of *Klebsiella pasteurii* sp. nov. *Front Microbiol.* 2019 25(10)2360.
- Mikhail S, Singh NB, Kebriaei R, *et al.*. Evaluation of the Synergy of Ceftazidime-Avibactam in Combination with Meropenem, Amikacin, Aztreonam, Colistin, or Fosfomycin against Well-Characterized Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63(8):e00779-19.. doi:10.1128/AAC.00779-19
- Moradigaravand D, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *mBio.* 2017; 8(1):e01976-16. doi:10.1128/mBio.01976-16
- Morrison L, Zembower TR. Antimicrobial Resistance. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2020;30(4):619-635. doi: 10.1016/j.giec.2020.06.004.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología Médica. 7^a ed. España: Elsevier; 2013.
- Nagasaka Y, Kimura K, Yamada K, Wachino J, Jin W, Notake S, Yanagisawa H, Arakawa Y. Genetic profiles of fluoroquinolone-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* among cephalosporin-resistant *K. pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 2015; 21(2):224-33. doi:
- Nasiri G, Peymani A, Farivar TN, Hosseini P. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* collected from Qazvin and Tehran provinces, Iran. *Infect Genet Evol.* 2018; 64:219-224. doi: 10.1016/j.meegid.2018.06.030.
- Navon-Venezia S, Kondratyeva K y Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 2017; 41: 252–275.
- OMS PLAN DE ACCIÓN MUNDIAL SOBRE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS. Suecia, 2016. Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>
- OMS. 2020 Antibacterial Agents In Clinical And Preclinical Development: an overview and analysis. World Health Organization: Suecia, 2021. Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>
- OMS. Report on the Burden of Endemic Health Care-Associated Infection Worldwide. Suiza, 2011. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80135/9789241501507_eng.pdf?sequence=1

- OMS. Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. Suecia, 2015. Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>
- OMS/OPS. PREVENCIÓN Y CONTROL DE INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN DE LA SALUD. Washington D.C, 2017. Disponible en: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=publicaciones-tecnicas-investigacion-5602&alias=40356-prevencion-control-infecciones-asociadas-a-atencion-salud-recomendaciones-basicas-2018-356&Itemid=270&lang=es
- Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(11):3953-5. doi: 10.1128/AAC.00915-06.
- Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):e00088-17. doi: 10.1128/CMR.00088-17.
- Pérez-Sánchez M, Lozano-Zarain P. Determinación fenotípica y molecular de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de diferentes hospitales mexicanos. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2020.
- Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouvelekis LS, y Daikos GL. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *Pediatr Infect Dis J*. 2017; 36(10):1002-1005.
- Podschun R y Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. 1998; 11(4): 589–603.
- Pong CH, Harmer CJ, Flores JK, Ataide SF, Hall RM. Characterization of the specific DNA-binding properties of Tnp26, the transposase of insertion sequence IS26. *J Biol Chem*. 2021;297(4):101165. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101165.
- Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*. 2010; 13(6):151-171. doi:10.1016/j.drug.2010.08.003
- Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, Bush K, Hooper DC. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med*. 2006;12(1):83-8. doi: 10.1038/nm1347.
- Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Diallo TA, Criscuolo A y Brisse S. Description of *Klebsiella africanensis* sp. nov., *Klebsiella variicola* subsp. tropicalensis subsp. nov. and *Klebsiella variicola* subsp. *variicola* subsp. nov. *Research in Microbiology*. 2019; 170:165-170

- Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat*. 2016;29:13-29. doi: 10.1016/j.drup.2016.09.001.
- Rodríguez-Salgado, M. Frecuencia de infecciones asociadas a la atención de la salud en los principales sistemas de información de México. *BOLETÍN CONAMED – OPS*. 2018; 3(17) 16-20
- Roy Chowdhury P, Ingold A, Vanegas N, Martínez E, Merlino J, Merkier AK, Castro M, González Rocha G, Borthagaray G, Centrón D, Bello Toledo H, Márquez CM, Stokes HW. Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(7):3140-9. doi: 10.1128/AAC.01529-10.
- Rui Y, Lu W, Li S, Cheng C, Sun J, Yang Q. Integrons and insertion sequence common region 1 (ISCR1) of carbapenem-non-susceptible Gram-negative bacilli in fecal specimens from 5000 patients in southern China. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; 52(5):571-576. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.06.015. Epub 2018 Jun 28. PMID: 29960008.
- Sakamoto N, Akeda Y, Sugawara Y, Takeuchi D, Motooka D, Yamamoto N, Laolerd W, Santanirand P, Hamada S. Genomic Characterization of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* with Chromosomally Carried blaNDM-1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 26;62(12):e01520-18. doi: 10.1128/AAC.01520-18. PMID: 30323033; PMCID: PMC6256778.
- San Millan A. Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. *Trends Microbiol*. 2018;26(12):978-985. doi: 10.1016/j.tim.2018.06.007.
- Sarno R, Ha H, Weinsetel N, y Tolmasky M.E. Inhibition of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib-mediated amikacin resistance by antisense oligodeoxynucleotides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(10):3296-304.
- Silva-Sanchez J, Barrios H, Reyna-Flores F, Bello-Diaz M, Sanchez-Perez A, Rojas, T, Bacterial Resistance Consortium, y Garza-Ramos U. Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance (PMQR) Genes in Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Pediatric Clinical Isolates in Mexico. *PLOS ONE*. 2013; 8 (10)
- Singh L, Cariappa MP, Kaur M. *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen?. *Med J Armed Forces India*. 2016;72(Suppl 1):S59-S61.

- Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):664-89. doi: 10.1128/CMR.00016-09.
- Summers AO. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem. *Anim Biotechnol.* 2006;17(2):125-35. doi: 10.1080/10495390600957217.
- Thungapathra M, Amita-Sinha KK, Chaudhuri S R, Garg P, Ramamurthy T, Nair GB, & Ghosh A. Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes aac(6')-Ib, dfrA5, dfrA12, and ereA2 in class I integrons in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2002; 46(9): 2948–2955. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2948-2955.2002>
- Vanegas-Múnera JM, Jiménez-Quiceno JN. Resistencia antimicrobiana en el siglo XXI: ¿hacia una era postantibiótica? *Rev. Fac. Nac. Salud Pública.* 2020;38(1):e337759. DOI: <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v38n1e337759>
- Velásquez, Lorenzo, Moreno, Seza, Lizasoian, Moro: *Farmacología Básica y Clínica*, 18° ed., Ed. Panamericana. 2008
- Vieira DC, Lima WG, de Paiva MC. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) among Enterobacteriales in Latin America: a systematic review. *Mol Biol Rep.* 2020; 47(2):1471-1483. doi: 10.1007/s11033-019-05220-9. Epub 2019 Dec 7. PMID: 31813128.
- Villa L, Poirel L, Nordmann P, Carta C, Carattoli A. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the blaNDM-1, blaCTX-M-15 and qnrB1 genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1645 –1650. doi:10.1093/jac/dks114
- Wang F, Wu K, Sun J, Wang Q, Chen Q, Yu S, Rui Y. Novel ISCR1-linked resistance genes found in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 40(5):404-8. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.06.016.
- Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(17):6278. doi: 10.3390/ijerph17176278.
- Wick RR, Heinz E, Holt KE y Wyres KL. Kaptive Web: user-friendly capsule and lipopolysaccharide serotype prediction for *Klebsiella* genomes. *J. Clin. Microbiol.* 2018; doi:10.1128/JCM.00197-18
- Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2018; 45:131-139. doi: 10.1016/j.mib.2018.04.004.

12. Anexos.



Anexo 1. Resistencia a aminoglucósidos y quinolonas. A) Número de cepas de *K. pneumoniae* con resistencia completa, intermedia o susceptibles. B) Número de cepas de *K. oxytoca* con resistencia completa, intermedia o susceptibles.

Anexo 2. Cepas resistentes a aminoglucósidos y EMA

Hospital regional ISSSTE, Puebla.							
Clave cepario	Servicio	Origen de la muestra	Fenotipo de resistencia			acc6'-Ib	acc3-II
			AMK	GEN	TB		
KpE1	MF		S	R	R	+	+
KpE3	UTTP		R	R	R	+	+
KpE4			I	R	R	+	+
KpE5	PEDH		S	R	R	+	+
KpE6	PEDH		S	R	R	+	+
KpE7	PEDH	PCVC	S	R	R	+	+
KpE8	MIH	U	R	R	R	+	+
KpE10	Nefrología	U	I	R	R	+	+
KpE11	MIH	U	R	S	I	-	-
KpE12			I	R	R	+	+
KpE14	MIH		I	R	R	+	+
KpE15	UCI		I	R	R	+	+
KpE16	UROC		S	R	R	+	+
KpE19	MIH		S	R	R	+	+
KpE22	Nefrología	LBA	I	R	R	+	+
KpE23	UROC	U	I	S	S	-	-
KpE25	Nefrología	U	R	R	R	+	+
KpE26	PEDH	PCVC	R	R	R	+	-
KpE28	MIH	Ex	I	R	R	-	+
KpE31	CIRH		S	R	R	+	-
KpE32	CIRH	Hd	I	R	R	+	+
KpE33	UCI	LBA	R	R	R	+	+
KpE38	MIH	Ex	R	R	R	+	+
KpE39	UCIN	HCA	I	R	R	+	+
KpE40	Pediatría	CM	S	R	R	+	+
KpE41	Ginecología	EV	R	R	R	+	+
KpE42	UCIN	U	I	R	R	+	+
KpE44	CIRH	CLP	S	R	R	+	+
KpE45	Nefrología	CS	I	R	R	+	+
KpE46	MIH	LBA	S	R	R	+	+
KpE47	MIH	U	I	R	R	+	+
KpE49	MIH	LBA	S	R	R	+	+
KpE50	MIH	HP	S	R	R	+	+
KpE52	DPCA	CS	S	R	R	+	+
KpE54	MF	U	S	R	R	+	+
KpE55	Nefrología	U	S	R	R	+	+
KpE56	UROC	U	S	R	R	+	+
KpE58	MIH		S	R	R	+	+
KpE59	MIH	U	I	R	R	+	+
KpE60	MIH	HP	I	R	R	+	+
KpE62	Nefrología	EN	S	R	R	+	+
KpE64	Cirugía	H	S	R	R	+	+
KpE66	UCIN	LBA	R	R	R	-	-

Anexo 2. Cepas resistentes a aminoglucósidos y EMA encontradas. (Continuación)

Hospital regional ISSSTE, Puebla.							
Clave cepario	Servicio	Origen de la muestra	Fenotipo de resistencia			acc6'-Ib	acc3-II
			AMK	GEN	TB		
KpE67	Cirugia	HCA	I	R	R	+	+
KpE68	UCIN	HCA	R	R	R	-	-
KpE69	UCIN	CS	R	R	R	-	-
KpE70	MIH		S	R	R	+	+
KpE72	Nefrología	U	S	S	S		
KpE74	MIH	LBA	R	R	R	-	-
KpE75	CIRH	HCA	S	S	S		
KpE76	PEDH	H	R	R	R	-	-
KpE77	PEDH	C	R	R	R	-	-
KpE78	UCI	LBA	S	S	R	+	-
KpE79	ONCO	CS	S	R	R	+	+
KpE80	PEDH	H	R	R	R	-	-
KpE81	PEDH	LBA	R	R	R	-	-

IMSS Tlalnepantla.							
Clave cepario	Servicio	Origen de la muestra	Fenotipo de resistencia			acc6'-Ib	acc3-II
			AMK	GEN	TB		
KpS1	Piso 6 CP	H	I	R	R	+	+
KpS2	Pediatría	H	R	R	R	+	+
KpS3	Piso 6CP	H	I	R	R	+	+
KpS5	Pediatría	H	I	R	R	+	+

Hospital para el Niño Poblano.							
Clave cepario	Servicio	Origen de la muestra	Fenotipo de resistencia			acc6'-Ib	acc3-II
			AMK	GEN	TB		
KpN29		LDP	I	S	R	+	-
KpN39		TR	S	S	R	+	-

Hospital ISSSTEP, Puebla.							
Clave cepario	Servicio	Origen de la muestra	Fenotipo de resistencia			acc6'-Ib	acc3-II
			AMK	GEN	TB		
KpP2	Geriatría	CS	S	S	R	+	-
KpP6	Geriatría	CSF	S	R	R	+	+
KpP7	Cirugia General	CS	S	R	R	-	+

Anexo 3. Cepas resistentes a quinolonas y determinantes de RQMP encontrados.

Hospital Regional ISSSTE, Puebla.								
Clave cepario	Servicio	Origen de la muestra	Fenotipo de Resistencia				qnrB	qnrA
			CIP	LVX	NOR	NAL		
KpE1	MF		R	R	R	R	+	-
KpE3	UTTP		R	R	R	R	+	-
KpE4			R	R	R	R	+	-
KpE5	PEDH		R	I	I	I	+	-
KpE6	PEDH		R	R	R	R	+	-
KpE7	PEDH	PCVC	R	I	I	R	+	-
KpE8	MIH	U	R	R	R	R	+	-
KpE10	Nefrología	U	R	R	R	R	+	-
KpE11	MIH	U	R	R	R	R	+	-
KpE12			R	R	R	R	+	-
KpE14	MIH		R	R	R	R	+	-
KpE15	UCI		R	R	R	R	-	-
KpE16	UROC		R	S	I	I	+	-
KpE19	MIH		R	R	R	R	+	-
KpE23	UROC	U	R	R	R	R	+	-
KpE25	Nefrología	U	R	R	R	R	+	-
KpE26	PEDH	PCVC	I	S	S	I	-	-
KpE28	MIH	Ex	I	S	I	I	+	-
KpE31	CIRH		R	S	I	I	+	-
KpE32	CIRH	Hd	R	R	R	R	+	-
KpE33	UCI	LBA	R	R	R	R	+	-
KpE38	MIH	Ex	R	I	I	I	+	-
KpE39	UCIN	HCA	I	S	I	I	+	-
KpE40	Pediatría	CM	R	R	R	R	+	-
KpE41	Ginecología	EV	R	R	R	R	+	-
KpE42	UCIN	U	R	S	I	I	+	-
KpE44	CIRH	CLP	R	R	R	R	+	-
KpE45	Nefrologia	CS	R	R	R	R	+	-
KpE46	MIH	LBA	R	R	R	R	+	-
KpE47	MIH	U	R	R	R	R	+	-
KpE49	MIH	LBA	R	R	R	R	+	-
KpE50	MIH	HP	R	R	R	R	+	-
KpE52	DPCA	CS	R	R	R	R	+	-
KpE54	MF	U	R	R	R	R	+	-
KpE55	Nefrología	U	R	R	R	R	+	-
KpE56	UROC	U	R	R	R	R	+	-
KpE58	MIH		R	R	R	R	+	-
KpE59	MIH	U	R	R	R	R	+	-
KpE60	MIH	HP	R	R	R	R	+	-
KpE62	Nefrologia	EN	R	R	R	R	+	-
KpE64	Cirugia	H	I	I	I	I	+	-
KpE67	Cirugia	HCA	R	I	I	I	+	-
KpE70	MIH		R	S	I	I	+	-
KpE72	Nefrología	U	I	I	S	I	+	-
KpE75	CIRH	HCA	R	R	R	R	-	-
KpE78	UCI	LBA	I	S	I	I	+	-
KpE79	ONCO	CS	R	I	I	I	-	-

Anexo 3. Cepas resistentes a quinolonas y determinantes de RQMP encontrados.
(continuación)

IMSS, Tlalnepantla.								
Clave cepario	Servicio	Origen de la muestra	Fenotipo de Resistencia				qnrB	qnrA
			CIP	LVX	NOR	NAL		
KpS1	Piso 6 CP	H	R	S	I	I	-	-
KpS2	Pediatría	H	R	S	I	I	+	-
KpS3	Piso 6CP	H	I	S	I	I	+	-
KpS5	Pediatría	H	R	S	R	I	+	-

Hospital para el Niño Poblano.								
Clave cepario	Servicio		Fenotipo de Resistencia				qnrB	qnrA
			CIP	LVX	NOR	NAL		
KpN39		TR	R	R	R	R	+	-

Hospital ISSSTEP, Puebla.								
Clave cepario	Servicio	Origen de la muestra	Fenotipo de Resistencia				qnrB	qnrA
			CIP	LVX	NOR	NAL		
KpP2	Geriatría	CS	R	R	R	R	+	-
KpP6	Geriatría	CSF	R	R	R	R	+	-
KpP7	Cirugía General	CS	R	S	I	I	+	-

Anexo 4. Tabla de la posición de los genes de interés en los nodos de los ensambles.

Cepa	Nodo	Longitud del nodo	Gen	Identidad	Posición en el contig
Kpn33	28	57475 pb	<i>qnrB4</i>	100	44942..45586
	47	10778 pb	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	99.422	8972..9490
	63	2886 pb	<i>aac(3)-IIa</i>	99.7	171..1031
Kpn47	28	13795 pb	<i>qnrB1</i>	100	948..1592
	37	2440 pb	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	100	232..1092
	35	2915 pb	<i>aac(3)-IIa</i>	100	1668..2267
Kpn115	48	2440 pb	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	100	174..773
	45	2960 pb	<i>aac(3)-IIa</i>	100	278..1138
Kpn125	25	73969 pb	<i>qnrB4</i>	100	61436..62080
	51	10778 pb	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	99.422	8972..9490
	71	2886 pb	<i>aac(3)-IIa</i>	100	171..1031
CM155	40	15544 pb	<i>qnrB2</i>	100	7586..8230
CM175	55	2340 pb	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	100	124..723

A) > test sequence
Length of sequence- 1060
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters - 3
Promoter Pos: 387 LDF- 4.53
-10 box at pos. 372 GTTTACCAT Score 49
-35 box at pos. 351 TTGACG Score 60
Promoter Pos: 789 LDF- 2.00
-10 box at pos. 774 ATCTAAGCT Score 43
-35 box at pos. 753 GTGCAT Score 17
Promoter Pos: 63 LDF- 1.40
-10 box at pos. 48 GGCTGTAAT Score 47
-35 box at pos. 24 TTGCCC Score 39

Oligonucleotides from known TF binding sites:

For promoter at 387:
phoB: ACGCATAA at position 354 Score -
lexA: TACTGTAT at position 389 Score -

For promoter at 789:
ilvY: ATATATCA at position 757 Score -

No such sites for promoter at 63

B) > test sequence
Length of sequence- 1279
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters - 3
Promoter Pos: 608 LDF- 4.47
-10 box at pos. 593 GTTTACCAT Score 49
-35 box at pos. 572 TTGACG Score 60
Promoter Pos: 955 LDF- 1.97
-10 box at pos. 940 GAATATGAT Score 49
-35 box at pos. 919 TTTCCG Score 36
Promoter Pos: 180 LDF- 1.37
-10 box at pos. 165 AGATCGGAT Score 6
-35 box at pos. 144 TTGCCA Score 61

Oligonucleotides from known TF binding sites:

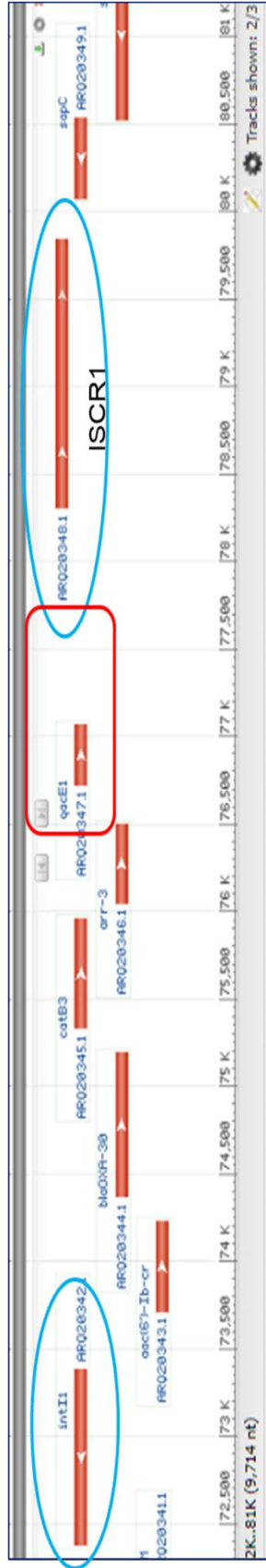
For promoter at 608:
phoB: ACGCATAA at position 575 Score - 7
lexA: TACTGTAT at position 610 Score - 9

No such sites for promoter at 955

For promoter at 180:
rpoD17: AGATCGGA at position 165 Score - 7

Anexo 5. Resultados de Bprom. A) cepa CM155. B) Cepa Kpn47. Se señala la predicción de *lexA* como regulador.

c)



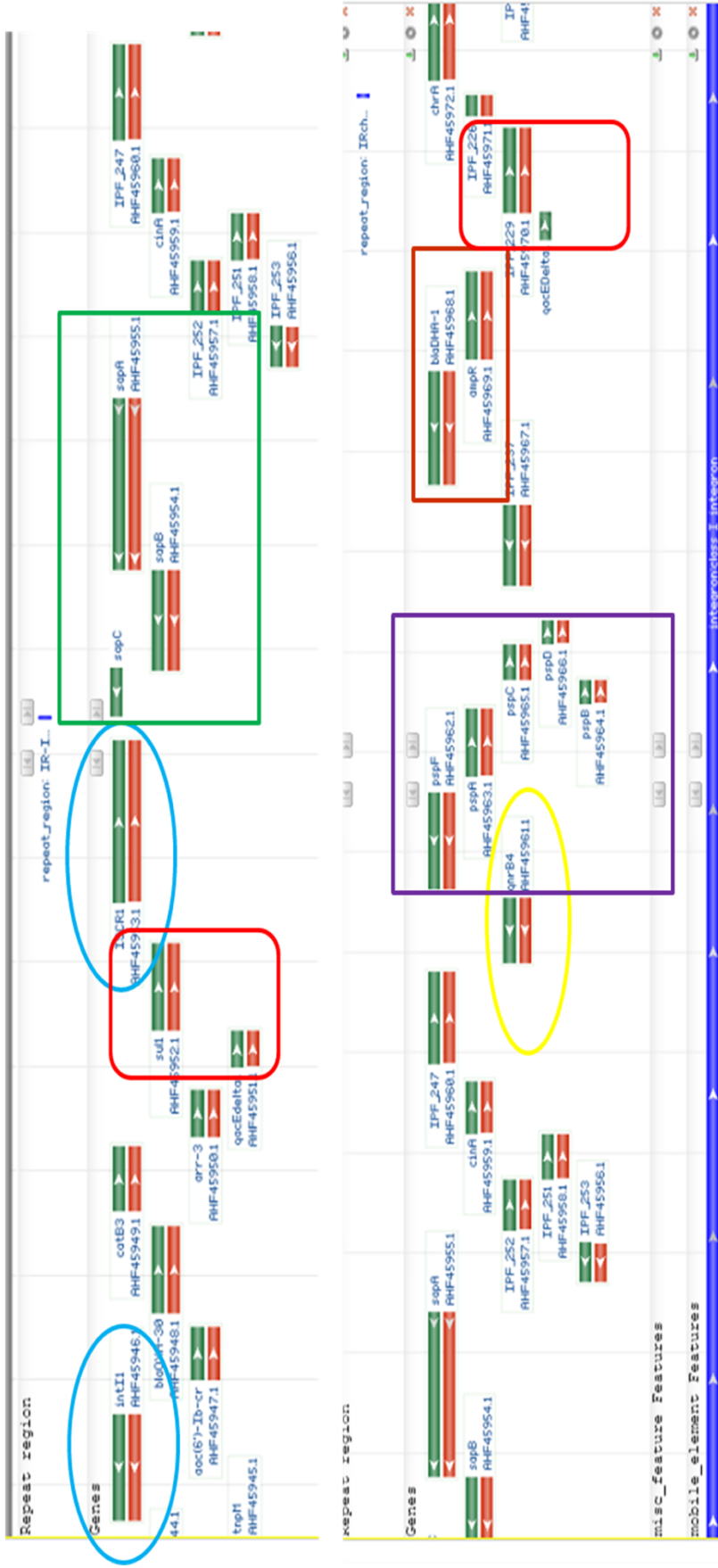
d)



Anexo 6. Secuencias portadoras de *qnrB4* reportadas en el GenBank. (Continuación). C) KY751925.1

D) KT225462.1. Se señala con óvalos azules *int1* y/o *ISCR1*. En rectángulos rojos: *blaDHA-1*. Rectángulos con las esquinas redondas: 3'-RC. Rectángulo morado: operon *psp*. Óvalo amarillo: *qnrB4*. Rectángulo verde: operon *sap*.

E)



Anexo 6. Secuencias portadoras de *qnrB4* reportadas en el GenBank. (Continuación). E) KF793937.1. Se señala con óvalos azules *int11* y/o *ISCR1*. En rectángulos rojos: *blaDHA-1*. Rectángulos con las esquinas redondas: 3'-RC. Rectángulo morado: operon *psp*. Óvalo amarillo: *qnrB4*. Rectángulo verde: operón *sap*.

Assembly	C329PPlacnet	C3130spades	C3130Placnet	Kpn115Placnet	Kpn115Spades	Kpn125Placnet	Kpn125Spades	Kpn33Placnet	Kpn33Spades	Kpn47Placnet	Kpn47SPades
# contigs (>= 0 bp)	175	132	173	137	153	168	493	644	180	5190	213
# contigs (>= 1000 bp)	71	52	71	62	72	61	136	136	81	533	46
# contigs (>= 5000 bp)	50	32	43	36	48	42	90	86	56	147	31
# contigs (>= 10000 bp)	43	36	28	28	41	36	76	73	48	73	28
# contigs (>= 25000 bp)	34	23	24	22	36	31	59	52	40	33	24
# contigs (>= 50000 bp)	29	19	19	13	29	25	38	31	28	17	21
Total length (>= 0 bp)	5403938	5421207	5543958	5557939	5457797	5488542	5680135	5737879	5646461	6616696	5516398
Total length (>= 1000 bp)	5382966	5394464	5522951	5533284	5431490	5445947	5568236	5582911	5603949	5251576	5441766
Total length (>= 5000 bp)	5333284	5351368	5454669	5475216	5379243	5408164	5454324	5467186	5547466	4432409	5407677
Total length (>= 10000 bp)	5285898	5328359	5408753	5419899	5326892	5359572	5349783	5368845	5493375	3918811	5385831
Total length (>= 25000 bp)	5136901	5251491	5196296	5315640	5253455	5271882	5090080	5037583	5387519	3266974	5318136
Total length (>= 50000 bp)	4954495	5073156	5031999	4985548	4988606	5053256	4316548	4325577	4046011	2743049	5227807
# contigs	83	61	79	69	79	72	169	173	95	789	75
Largest contig	415/41	1141/03	1115005	1116011	582955	583104	257148	312638	389482	448709	927414
Total length	5391213	5400919	5528472	5537852	5436518	5452414	5591925	5609998	5613184	5434597	5460056
GC (%)	57.36	57.37	57.19	57.18	57.33	57.31	57.22	57.24	57.22	57.33	57.20
N50	183538	350444	348492	468516	202625	220206	97610	131303	213061	50098	307699
N75	106301	191719	152180	310199	109686	129570	58616	61170	109024	8522	161293
L50	10	5	5	4	9	8	18	14	11	17	6
L75	19	10	10	8	18	15	36	29	20	91	12
# N's per 100 kbp	0.00	190.97	0.00	63.45	24.54	0.00	42.69	51.44	0.00	230.39	0.00

Anexo 7. Resultados de calidad de ensamblajes. Realizados con Quast. Se analizaron los ensamblajes obtenidos por Spades 3.9 y Velvet de PlacnetW.