

# Instrucciones generales

## Rev. ACCEFYN

- Tamaño de las paginas 21,5 x 28 (tamaño carta)
- Fuente a usar: Times new Roman
- En la primera pagina antes del titulo se deja una reserva en blanco correspondientes a 4 saltos de linea
- Título del artículo en negrilla a 14 ptos, segundo titulo en gris y en negrilla a 14 puntos.
- Autores (negrilla- 9 ptos), filiación (regular-8 ptos)
- Resumen (texto a 9 puntos)
- Los titulos de sección como abstract, resumen, introducción, materiales y metodos, resultados, conclusiones y referencias van en negrilla a 13 puntos con un salto de linea antes de comenzar sección.
- Los subtítulos de cada sección van en negrilla y en cursiva con salto de linea anterior, excepto cuando le sigue al titulo de la sección.
- Los titulos de sección, subtítulos y el parrafo inicial van sin sangría, los demás con sangría de 6mm.
- Las referencias deben aparecer en negrilla dentro del texto del articulo y cuando lleva (*et al.*) este debe ir en cursiva.

The Gram-negative bacterium Kpn can be found in the environment as well as in healthy individuals but is nonetheless an important cause of community and hospital-acquired infections. This microorganism is part of the ESKAPE group of pathogens, which includes *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, and *Enterobacter* spp., known for their ability to escape the effects of commonly used antibiotics (Pendleton, *et al.*, 2013). It is estimated that Kpn is the cause of a significant amount of hospital-acquired infections in the Western world that can result in hepatic abscesses, septicemia, and respiratory and urinary infections, among others (Shon, 2013). This opportunistic pathogen affects mainly adults, neonates, and immunocompromised patients. However, the emergence of the hypervirulent hvKP strain, capable of infecting healthy individuals and readily acquiring and spreading resistance, has highlighted the risk posed by this pathogen (Lee, 2017).

- Las tablas o figuras pueden ir ajustadas al ancho de columna de texto o pueden extenderse si se requiere por el tamaño de la figura o tabla.
- Las leyendas de las tablas y figuras deben ir en tamaño de letra de 9 puntos dejando en negrilla el texto que refiere que tabla o figura es.

Ejemplo: **Table 1.** Bacterial strains and plasmids

**Figure 1.** Confirmation of plasmid transfer.

- Se debe incluir el párrafo de conflicto de intereses antes de las referencias.
- Se deben tener en cuenta las márgenes que se muestran en las siguientes páginas, ya que son espacios de reserva para datos de la revista.

## Área del conocimiento

Reserva en blanco en la  
primera página antes del  
título correspondiente a 4  
saltos de línea

## Tipología del artículo

**The effect of aminoglycosides on horizontal gene transfer in *Klebsiella pneumoniae*** (negrilla 14 puntos)**El efecto de los aminoglucósidos de genes en *Klebsiella pneumoniae*** (negrilla gris 14 puntos)

 Iván Camilo Acosta<sup>1,2</sup>,  Leonardo Posada<sup>1</sup>,  Mónica Gabriela Huertas<sup>1,3</sup>,  
 María Mercedes Zambrano<sup>1,\*</sup> (negrilla 9 puntos)

<sup>1</sup> Corporación Corpogen, Bogotá D.C., Colombia<sup>2</sup> Centro Nacional de Biotecnología, Madrid, España<sup>3</sup> Universidad El Bosque, Bogotá D.C., Colombia (texto a 8 puntos)margen izquierda  
6,9 cm**Abstract** (texto negrilla a 13 puntos)

Antibiotic-resistant bacteria represent a global risk to public health. Horizontal gene transfer, a common mechanism for genetic exchange in bacteria, plays an essential role in the acquisition of resistance genes. In this work, we evaluated the effect of sub-lethal concentrations of antibiotics on plasmid transfer by conjugation and transformation in the opportunistic pathogen *Klebsiella pneumoniae*. Despite not being naturally competent, this bacterium could acquire extracellular DNA from various plasmids at a very low frequency, which increased upon incubating cells with the aminoglycoside antibiotics amikacin and gentamicin. Transfer by conjugation analyzed using a clinical isolate carrying plasmid pNDM-1 also increased in the presence of sub-lethal concentrations of antibiotics. An RNAseq analysis showed differential expression of several genes when cells were incubated in the presence of sub-lethal concentrations of amikacin suggesting metabolic and regulatory changes, as well as alteration of cell envelope components that could affect the uptake of foreign DNA. These results suggest that sub-lethal concentrations of some aminoglycosides, in particular amikacin, can promote the transfer of resistance-bearing genetic elements in *K. pneumoniae*, which is relevant for understanding the spread of resistance determinants in this human pathogen. (texto a 9 puntos)

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*; Horizontal gene transfer; Antibiotic resistance, aminoglycosides.**Resumen** (texto negrilla a 13 puntos)

Las bacterias resistentes a antibióticos representan un riesgo global para la salud pública. La transferencia horizontal de genes, que permite el intercambio de material genético en bacterias, tiene un papel importante en la adquisición de genes de resistencia. En este trabajo se evaluó el efecto de concentraciones subletales de antibióticos en la transferencia de plásmidos por conjugación y transformación en el patógeno oportunista *Klebsiella pneumoniae*. Aunque esta bacteria no es naturalmente competente, mostró capacidad para adquirir ADN extracelular de diversos plásmidos con muy baja frecuencia, la cual aumentó al incubar células con los antibióticos aminoglucósidos amikacina y gentamicina. La transferencia por conjugación, que se hizo con un aislamiento clínico portador del plásmido pNDM-1, también aumentó en presencia de concentraciones subletales de antibióticos. Un análisis de RNA-Seq evidenció la expresión diferencial de varios genes al incubar células en presencia de concentraciones subletales de amikacina, lo que indica cambios metabólicos, regulatorios y a nivel de componentes de la envoltura celular. Estos resultados revelan que la incubación en concentraciones subletales de algunos aminoglucósidos, en particular la amikacina, pueden alterar las propiedades celulares y promover la transferencia de elementos genéticos portadores de resistencias en *K. pneumoniae*, lo cual tiene relevancia para entender la diseminación de genes de resistencia en este patógeno humano.

**Palabras clave:** *Klebsiella pneumoniae*; Transferencia horizontal de genes; Resistencia a antibióticos, aminoglucósidos.

**Citation:** Nombres de autores. Título del artículo. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(170):000-120, enero-marzo de 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.18257/raccefyn.000>

Editor: Nombre editor

\*Corresponding autor:

Nombre autor  
email@correo.com

Received: February 10, 2020

Accepted: February 10, 2020

Published: February 10, 2020



This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

margen izquierda  
 6,9 cm

Sin sangría

Sangría de 6 mm

Salto de línea

**Introduction** (texto negrilla a 13 puntos)

Antibiotics have undoubtedly improved health and life expectancy and have revolutionized modern medicine. These medications allow the control of previously untreatable bacterial infections and have increased the therapeutic success of high-risk medical interventions such as surgeries and chemotherapies. Despite their great success, we are currently facing a crisis due to the emergence of antibiotic-resistant microorganisms that represent a risk to global human health and, thus, require immediate measures to prevent therapeutic failure and ensure a continuous and effective treatment of bacterial infections.

Microorganisms and their antibiotic resistance genes (ARG) are ubiquitous and diverse (Allen, 2010). Many studies on ARGs present in natural environments have been done using metagenomics in which analysis of genes and genomes replaces the culturing of microorganisms. This approximation can provide information on both the taxonomic profiles and the metabolic repertoire of the microbial communities studied. Based on these analyses, we know that ARGs are present in intact and relatively pristine ecosystems such as the ancestral permafrost (D’Costa, 2011), Alaskan soils and cave communities (Allen, 2009; Bhullar, 2012), as well as in the human microbiome and in more heavily contaminated sites such as lakes, rivers, and wastewater treatment plants (Marti, 2014; Posada-Perlaza, 2019; Rizzo, 2013).

Antimicrobial resistance is gained either by mutations or by the acquisition of genes via horizontal gene transfer (HGT). Microorganisms have the genomic plasticity and capacity to access genetic material from other microbes and share genes (Gaze, 2013).

**Methods** (texto negrilla a 13 puntos)

**Bacterial strains, plasmids, and growth conditions** (negrilla, cursiva en 10 puntos)

Bacteria and plasmids used are listed in table 1. All strains were stored at -80°C in Luria Bertani (LB, oxoid) broth supplemented with 20% glycerol. When necessary, antibiotics (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were added: Ampicillin (Amp, 200µg ml<sup>-1</sup>).

**Transformation on agar**

For natural transformation assays, we followed the previously used protocol (Zhang, et al., 2012) with some modifications (Table 1). were added to the cell suspension. This mix was spread immediately onto LB agar with Amp (200 µg ml<sup>-1</sup>). When using the antibiotics Cam and Gen, the mix was spread for 3 h on LB before selection with the antibiotic.

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids (Tabla al ancho de pagina, cuando contiene demasiada información)

Strains and plasmids	Main features	Reference	Plasmid
<b>Strains</b>			pUC19
Kpn CH404	LM21 SHV-1: <i>aadA7-gfpmut3</i> ; Spc <sup>R</sup>	(Balestrino, et al., 2008)	pUC19
Kpn 16Kp1	Clinical isolate with <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> encoding plasmid	(Escobar-Pérez, et al., 2013)	pBAD18-yfiN
Kpn ATCC700603	Conjugation control	(Rasheed, et al., 2000)	pMP2444

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids (Formato de tabla al ancho de columna de texto)

Strains and plasmids	Main features	Reference
<b>Strains</b>		
Kpn CH404	LM21 SHV-1, Control (24h)	(Balestrino, et al., 2008)
Kpn 16Kp1	Clinical isolate	(Escobar-Pérez, et al., 2013)
Kpn ATCC700603	Conjugation control	(Rasheed, et al., 2000)

Margen  
 1,9 cm

margen inferior  
 2,3 cm

margen superior  
 3,1 cm

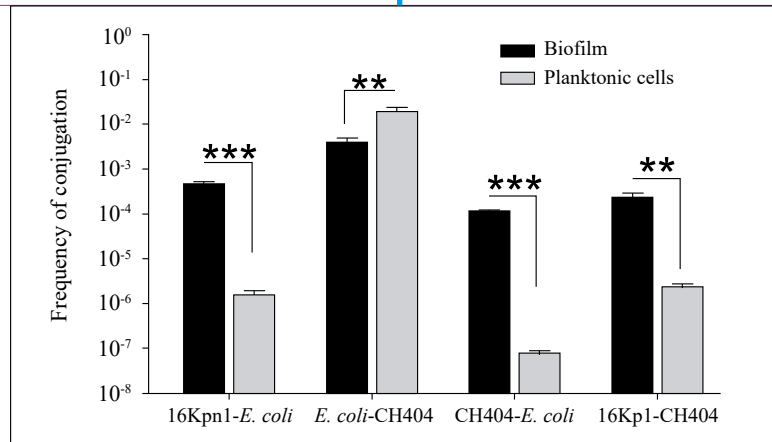


Figure 2. Frequency of conjugation by pNDM-1. (Formato de figura al ancho de columna de texto)

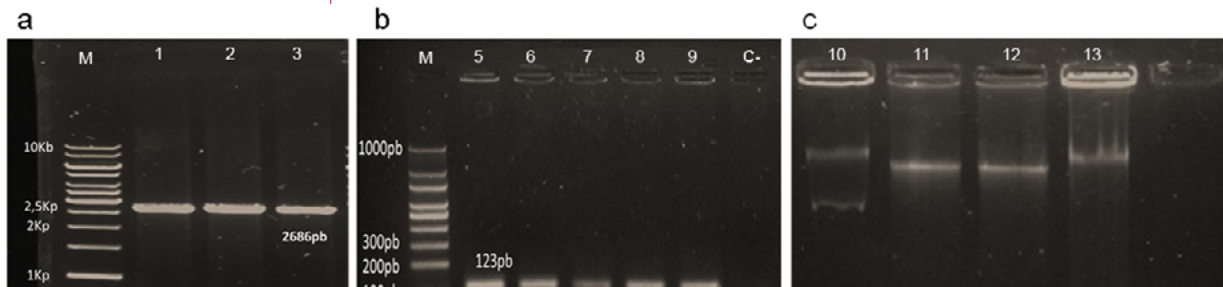


Figure 1. Transformation (a) XbaI digestion o and (b) PCR amplification (c) pNDM-1 plasmid DNA extraction from Kpn strain 16Kpn1. (figura al ancho de la página, cuando es necesario mostrar los datos a mayor tamaño o contiene demasiada información)

Margen  
 1,9 cm

## Conclusions

Sub-lethal concentrations of antibiotics present in diverse environments can favor the appearance of resistance to these drugs and the spread of ARGs by HGT.

## Acknowledgments

First time ago, once text false (Project No. 657kl00031675).

## Authors' contribution

SGA performed most of the experimental work, analyzed the data and drafted the document; MGH helped in biofilm and antimicrobial resistance analyses; MMZ coordinated the work.

## Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References (texto negrilla a 13 puntos)

En fuente times new roman, regular de 9 puntos. Sangría francesa de 9 mm. Ejemplo:  
 Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., Handelsman, J. (2010). Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol.* 8 (4): 251-259.  
 Allen, H. K., Moe, L. A., Rodbumrer, J., Gaarder, A., Handelsman, J. (2009). Functional metagenomics reveals diverse  $\beta$ -lactamases in a remote Alaskan soil. *ISME J.* 3 (2): 243-251.  
 Anders, S. & Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11 (10): R106.

margen izquierda  
 6,9 cm

margen inferior  
 2,3 cm