



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Caracterización genética de
aislamientos de *Klebsiella
pneumoniae*, resistentes a
carbapenémicos, remitidos al grupo
de resistencia bacteriana de Bogotá
GREBO por hospitales del distrito,
en un periodo de 3 años**

Edna Catering Rodríguez Cárdenas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad, de Ciencias Departamento de Microbiología
Bogotá, Colombia
2014

**Caracterización genética de aislamientos de
Klebsiella pneumoniae, resistentes a
carbapenémicos, remitidos al grupo de
resistencia bacteriana de Bogotá GREBO
por hospitales del distrito, en un periodo de
3 años**

Edna Catering Rodríguez Cárdenas

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias- Microbiología

Directora:

MD, Master of Science in Diseases Control

Aura Lucia Leal Castro

Codirector:

Magister en Ciencias-Microbiología

Jaime Enrique Moreno Castañeda.

Línea de Investigación:

Epidemiología molecular de la infección intrahospitalaria

Universidad Nacional de Colombia

Facultad, de Ciencias Departamento de Microbiología

Bogotá, Colombia

2014

A mi todo en la vida:

*Al padre, a la madre, al esposo y a los amigos por
sacrificar nuestro tiempo juntos para verme feliz.*

*...Si ya no puede ir peor
Haz un último esfuerzo
Espera que sople el viento a favor....*

*....Y si sólo puede ir mejor
Y está cerca el momento
Espera que sople el viento a favor.....*

Agradecimientos

Al apoyo incondicional, de la Doctora Aura Lucia Leal Castro, gestora del proyecto. Sus aportes académicos proporcionaron a este trabajo, una visión más amplia, de nuestros resultados a la luz del control de infecciones a nivel clínico. Pero su forma personal de ver la vida y su incansable preocupación por enseñarme el valor de las cosas bien hechas, me permitió vivir una experiencia universitaria maravillosa, profesional y personalmente. Y eso, no termina de agradecerse nunca.

A los hospitales del Grupo GREBO, porque su participación activa en la vigilancia de la resistencia hizo posible contar con los aislamientos que se caracterizaron en este trabajo. Sandris, de todas las personas maravillosas que conocí Tú, Gracias por nunca decir NO y Marívi, mi primera gran maestra porque gracias a ti descubrí lo que me gusta hacer en la vida. Olguita y Anita por el apoyo logístico y personal al desarrollo del proyecto.

A todo el grupo ALERTA de la División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Federal de San Pablo (UNIFESP). Especialmente a la Doctora Ana Cristina Gales Directora del laboratorio, por permitirme conocer su bello país y aceptarme en su laboratorio. Y más especialmente al Doctor Rodrigo Cayò por el tiempo y la paciencia para transmitirme todo su conocimiento especializado en el montaje e interpretación de técnicas de caracterización genética (en tiempo record), ah y por supuesto por ser una persona espectacular. Ana Streling, por ser mi compañera en largas jornadas de trabajo. Y a los demás chicos por tratar de entender mi portuñol.

Gracias a la gestión administrativa, técnica y al apoyo personal de María Elena Realpe Delgado coordinadora del Grupo de Microbiología (INS) sin las cuales no hubiera sido posible desarrollar el proyecto enmarcado en las actividades del grupo. A Jaime Moreno Castañeda por su tutoría y orientación técnica para conseguir los objetivos de este trabajo y todo sin hacerme llorar.

Resumen

Klebsiella pneumoniae resistente a carbapenémicos (KPRC) es una de las especies de Enterobacterias, más comúnmente aisladas en el mundo, siendo la variante KPC-2 la reportada más ampliamente, la variante KPC-3 se ha relacionado sobre todo con brotes en hospitales. En Colombia la población bacteriana productora de carbapenemasas es endémica. Sin embargo, en aislamientos de enviados GREBO dentro de las actividades de vigilancia, la variante KPC-3 fue identificada más frecuentemente en varios hospitales de Bogotá, durante tres años consecutivos. Buscando caracterizar mejor este fenómeno en Bogotá, decidimos determinar las características genéticas de 82 aislamientos. La Concentración Inhibitoria Mínima encontradas frente a carbapenémicos los clasificaron como altamente resistentes y se encontraron diseminados en diferentes grupos clonales. Se realizó un estudio más detallado de 6 representantes de los grupos clonales. Todos fueron productores de TEM-1 y SHV-12, tienen un integrón clase I con dos genes cassettes, *dfrA12* y *aadA2*. El estudio de porinas, mostro que la *OmpK35* no se expresó en ninguno de los clones evaluados, mientras que a *OmpK36*, mostro una IS5 en dos aislamientos, para el gen *OmpK37* no se presentaron mutaciones. Todos los aislamientos pertenecieron al linaje clonal ST-258, la secuenciación del contexto del gen *bla_{KPC-3}* muestra que se encuentra flaqueando upstream por la *ISKpn7* (*ItsA* y *ItsB*), que está dentro del transposon *Tn4401*.

Nuestros resultados proporcionan un acercamiento a la diversidad genética de aislamientos tipo KPC-3, la cual se constituyó como el mecanismo de resistencia a carbapenémicos, más frecuente entre los aislamientos de Bogotá, lo que no es usual en América ya que esto se ha reportado más frecuentemente en Europa y Asia, aunque presentan características genéticas similares a las variantes KPC-2 reportadas previamente en Colombia. Nuestros hallazgos sugieren que la circulación y permanencia en el tiempo han incrementado la capacidad de estas cepas para adquirir mecanismos de resistencia adicionales y diseminarse hasta constituirse en un microorganismo de difícil contención a nivel hospitalario.

Palabras clave: Carbapenemasas *K. pneumoniae*, resistencia bacteriana

Abstract

Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) is one of the most commonly recovered Enterobacteriaceae species in the world. The variant producing the KPC-2 carbapenemase is the most frequently reported, and the variant KPC-3 has been mainly associated with nosocomial outbreaks. Colombia is considered an endemic country for strains producing both types of enzymes, however, during three consecutive years we have found KPC-3 in several non-outbreak related isolates in nine hospitals from Bogotá.

To better understand this phenomenon we determine the genetic characteristics to 82 isolates of *K. pneumoniae* isolates producing KPC-3 enzyme, recovered in Bogotá. We found high MIC to carbapenems and three major clonal groups scattered.

We perform a more detailed study on six representative isolates of clonal groups. All presented TEM-1 and SHV-12, and a class I integron with two gene cassettes, *dfrA12* and *aadA2*. The porin *OmpK35* was not expressed in any of the isolates, while the porins *OmpK36* and *OmpK37* were expressed, with two isolates presenting the mutation IS5 in the *OmpK36* porin. ST-258 was determined in all isolates, and the sequence of *bla*_{KPC-3} gene showed that it is flanking upstream by ISKpn7 (ITSA and ITSB), which is inside the transposon Tn4401 as previously reported.

Our results provide more insights into the genetic diversity of isolates producing KPC-3, which is the most common mechanism of resistance to carbapenems, although it has not been commonly reported in Latin America, but more frequently in Europe and Asia. However, similar genetic characteristics have been reported in KPC-2 isolates in Colombia. Our findings suggest that the circulation of *K. pneumoniae* has increased its ability to acquire additional mechanisms of resistance, which leads the microorganism to spread and become difficult to eradicate specially in hospitals.

Keywords: Carbapenemase, *K. pneumoniae*. Antimicrobial resistance.

Contenido

	Pág.
1. Capítulo Marco Teórico	3
1.1 Clasificación de las betalactamasas:.....	3
1.2 Descripción de las carbapenemasas tipo KPC.....	4
1.3 Epidemiología de carbapenemasas tipo KPC.....	5
1.3.1 Diseminación de las carbapenemasas tipo KPC en el mundo:.....	7
• Europa.....	7
• Asia.....	9
• Norte América:.....	10
• Sur América:.....	11
• Colombia:.....	12
1.4 Características genéticas de carbapenemasas tipo KPC.....	12
1.5 Diagnóstico microbiológico de carbapenemasas tipo KPC.....	14
1.5.1 Perfiles de sensibilidad frente a carbapenémicos:.....	15
1.5.2 Detección fenotípica de enzimas:.....	16
1.5.3 Caracterización genotípica de aislamientos con carbapenemasas tipo KPC.....	16
1.6 Antecedentes.....	18
2. Capítulo Metodología	21
2.1 Generalidades.....	21
2.1.1 Tipo de estudio.....	21
2.1.2 Población y muestra.....	21
2.2 Determinación de perfiles de sensibilidad antimicrobiana:.....	21
2.2.1 Difusión con discos.....	21
• Procedimiento.....	22
2.2.2 Prueba confirmatoria de doble disco con ácido clavulánico para enzimas tipo betalactamasas de espectro extendido BLEE.....	23
• Procedimiento.....	23
2.3 Test de Hodge modificado para la identificación de enzimas tipo carbapenemasas.....	24
• Procedimiento:.....	24
2.2.3 Prueba de Sinergia con ácido fenil borónico (APB) para el tamizaje de carbapenemasas clase A.....	25
• Procedimiento:.....	25
2.2.4 Microdilución:.....	25
• Procedimiento:.....	26
2.2.5 E-TEST:.....	27
• Procedimiento:.....	27

2.3	Determinación de las relaciones genéticas por técnicas de genotipificación estandarizadas	28
2.3.1	Electroforesis en gel con campo pulsado PFGE:	28
	• Procedimiento:	28
2.3.2	Tipo de secuencia de múltiples locus (MLST):.....	28
2.4	Caracterización del entorno genético del gen <i>bla</i> _{KPC}	29
	• Procedimiento:	29
2.5	Detección de genes de resistencia:.....	30
2.5.1	Detección de betalactamasas:.....	31
	• Condiciones de PCR para la detección de genes que codifican para enzimas TEM – SHV - GES:	31
	• Condiciones de PCR para la detección genes que codifican para enzimas tipo PER	31
	• Condiciones de PCR para la detección de genes que codifican para enzimas tipo OXA:	32
	• Condiciones de PCR para la detección de genes que codifican para enzimas CTX-M.....	34
2.5.2	Detección de genes que codifican para enzimas tipo metilasas:.....	35
	• Condiciones de PCR para la detección de <i>rmtA</i> , <i>rmtB</i> , <i>rmtC</i> , <i>rmtD</i> , <i>armA</i> , <i>npmA</i> :	35
2.5.3	Detección de genes que codifican para enzimas tipo acetilasas:.....	36
	• Condiciones de PCR para la detección de <i>aad</i> :.....	36
2.5.4	Detección plásmidos que confieren resistencia a fluoroquinolonas:.....	36
	• Condiciones de PCR para la detección de <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> y <i>qnrS</i>	37
2.6	Caracterización de plásmidos que portan genes que confieren resistencia a los antibióticos:.....	37
2.6.1	Plásmidos:.....	37
2.7	Integrone:.....	38
2.7.1	PCR para la detección de Integrone.	38
2.8	Porinas.....	39
2.8.1	PCR para la detección de genes que codifican para las porinas <i>OmpK35</i> , <i>OmpK36</i> y <i>OmpK37</i>	40
2.8.2	Visualización de porinas por SDS-PAGE	41
	• Procedimiento SDS-PAGE	41
3.	Capítulo Resultados	47
3.1	Características generales de los aislamientos.....	47
3.2	Determinación de perfiles de sensibilidad antimicrobiana:	47
3.2.1	Pruebas fenotípicas confirmatorias para BLEE y KPC:	47
3.2.2	Resultados de sensibilidad antimicrobiana:	47
	• Antibióticos aminoglucósidos:.....	48
	• Antibióticos betalactámicos:	48
	• Cefalosporinas	48
	• Carbapenémicos:	48
3.3	Determinación de la relación clonal por técnicas estandarizadas.....	50
3.3.1	PFGE:.....	50
3.3.2	MLST:.....	52
3.4	Caracterización del entorno genético del gen <i>bla</i> _{KPC} :	52
3.5	Detección de genes de resistencia a otros antibióticos	54

3.6	Detección de elementos genéticos que confieren resistencia a varias clases de antibióticos.....	55
3.6.1	Análisis de plásmidos	55
3.6.2	Análisis de Integrón Clase I	56
3.6.3	Análisis de porinas.....	57
4.	Capítulo Discusión y conclusiones.....	61
5.	Anexo A:.....	72
	• Protocolo para el desarrollo de la técnica de PFGE en aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
6.	Anexo B.....	73
	• Protocolo de laboratorio para la determinación de tipo de secuencia MLST para en aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
7.	Anexo: C.....	74
	• Secuencia obtenida para <i>bla</i> _{TEM-1} (<i>Klebsiella pneumoniae</i> H4)- 861pb	
8.	Anexo D:.....	75
	• Secuencia obtenida para <i>bla</i> _{SHV-12} (<i>Klebsiella pneumoniae</i> H4)- 861pb	
9.	Anexo E:.....	76
	• Integron de clase 1 (Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> K45) - 2237pb	
10.	ANEXO F:	78
	• Secuencia obtenida para <i>OmpK35</i> (<i>Klebsiella pneumoniae</i> H4) - 1081pb	
11.	ANEXO G:	79
	• Secuencia obtenida para <i>OmpK36</i> (<i>Klebsiella pneumoniae</i> H4) 1110 pb	
12.	ANEXO H:.....	80
	• Secuencia obtenida para <i>OmpK36</i> (<i>Klebsiella pneumoniae</i> K8) - 1104pb	
13.	ANEXO I:	81
	• Secuencia obtenida para <i>OmpK37</i> (<i>Klebsiella pneumoniae</i> H4) - 1115pb	
14.	Anexo J:	82
	• Contexto Genético <i>bla</i> _{KPC-3} (Aislado <i>Klebsiella pneumoniae</i> H4) - 2865pb	
15.	Bibliografía	85

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Características epidemiológicas de los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> productores de KPC por país de origen.....	11
Figura 2-1 Origen y adquisición de elementos genéticos móviles.....	14
Figura 1-3. Distribución de los halos obtenidos para IMI MER y ERT en los 82 aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> estudiados.....	49
Figura 2-3. Dendrograma de 82 aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> 2008 a 2010.....	51
Figura 3-3. Representación esquemática de las estructuras genéticas en aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC-3 recuperadas en Bogotá.....	53
Figura 4-3. Imagen de la región secuenciada en el aislamiento HT-4 de <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC-3 comparada con el aislamiento EU176014.....	53
Figura 5-3. Esquema de integrón clase I encontrado en los aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC-3 evaluados.....	56

Lista de tablas

Tabla 1-2. Iniciadores utilizados en la determinación y secuenciación de genes relacionados con resistencia bacteriana.....	44-45
Tabla 1-3. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos evaluados en aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> KPC-3 de Bogotá.....	49
Tabla 2-3. Datos de sensibilidad antimicrobiana de los seis aislamientos seleccionados para caracterización genética	50
Tabla 3-3. Alelos obtenidos por MLST para los 6 aislamientos seleccionados.....	52
Tabla 4-3. Resultados de PCR para detección de genes de resistencia en los 6 aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC-3.	55
Tabla 5-3. Resultados de la detección de porinas encontrado en los 6 aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC-3 evaluados	59

Introducción

La resistencia a los antimicrobianos plantea una amenaza cada vez mayor para la salud pública, en el mundo las cepas resistentes de algunos agentes infecciosos están repercutiendo de forma importante en el control de enfermedades. En 1995, debido a la alerta regional sobre la importancia de las enfermedades emergentes y reemergentes, entre las que se incluye la resistencia a los antibióticos, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reforzó sus actividades en este tema, creando la red de vigilancia de la susceptibilidad a los antibióticos la cual inició con aislamientos de *Salmonella spp*, *Shigella spp* y *Vibrio cholerae*, posteriormente, se incluyeron otras especies como *Streptococcus pneumoniae* (invasivos), *Haemophilus influenzae* (invasivos) *Neisseria meningitidis* y *Escherichia coli* (infección urinaria), igualmente especies aisladas en infecciones asociadas al cuidado de la salud (IAACS), tales como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Enterococcus spp*, *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.* {González-Salvatierra and Guzmán-Blanco, 1999} {Periago, 2011}

Uno de los principales problemas que han centrado la atención a nivel académico, científico, de las autoridades sanitarias y de la comunidad en general, son las infecciones producidas por enterobacterias resistentes a los carbapenémicos (ERC), las cuales están emergiendo como importantes patógenos en los centros de cuidado de salud {Schwaber and Carmeli, 2008}. Lo anterior debido principalmente a que los antibióticos de elección para el tratamiento de las infecciones producidas por Gram negativos; son precisamente betalactámicos de amplio espectro tales como cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona), betalactámicos en combinación con inhibidores de betalactamasas (piperacilina-tazobactam) y los carbapenémicos (meropenem y doripenem principalmente) {Thomson, 2010}.

La resistencia a este tipo de antibióticos puede resultar por la combinación de diversos mecanismos asociados, tales como la presencia de enzimas tipo betalactamasas sumada a una disminución de la permeabilidad de la membrana externa. También es producida por la presencia de enzimas tipo carbapenemasas como KPC sigla del inglés *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase y metalo betalactamasas, capaces de hidrolizar

antibióticos betalactámicos incluidos los carbapenémicos. La mayoría de estos tipos de carbapenemasas, se encuentran asociadas a elementos genéticos móviles, que les permiten la transferencia y diseminación en el ambiente hospitalario {Queenan and Bush, 2007}.

Muchos países aún no han establecido protocolos para la detección de los productores de carbapenemasas, sin embargo, se ha demostrado que la prevalencia puede diferir substancialmente por regiones, mientras que países como Israel, Grecia y Colombia son endémicos para este tipo de enzimas, hay lugares donde solo se han reportado casos importados (Australia, Nueva Zelanda y Canadá) {Munoz-Price et al., 2013}. Teniendo en cuenta las características de diseminación y el rápido incremento en el número de reportes a nivel mundial, el control de este mecanismo de resistencia es un tema que ha generado espacios de discusión y consenso en entidades de vigilancia epidemiológica internacionales. Tal es el caso de la OPS que, en el año 2010 generó una alerta regional donde direcciona a todos los laboratorios nacionales de referencia a priorizar la búsqueda de carbapenemasas a través de la red de vigilancia centinela en cada país, a fin de conocer la situación de cada uno de ellos y establecer las pautas de control y prevención. {OPS, 2010}. Otro de los aspectos relevantes para centrar esfuerzos en la detección de carbapenemasas, es que su presencia se ha asociado con incremento en la morbilidad y la mortalidad, particularmente de los pacientes infectados por *K. pneumoniae*, el cual puede ser el microorganismo causal del 20% al 30 % de los casos de neumonías asociadas al cuidado de la salud de la región, y se encuentra entre los tres primeros patógenos aislados en bacteriemias intrahospitalarias por Gram negativos {Lizaso and Aguilera, 2008} con tasas de mortalidad de más del 50% {Borer et al., 2009}, {Patel et al., 2008}, {Schwaber et al., 2008}.

La primera línea de contención de las bacterias resistentes a los antibióticos debe estar direccionada por los laboratorios de microbiología, que son responsables de la adecuada detección de los mecanismos de resistencia, la investigación de la prevalencia y la información a las autoridades de control de infecciones hospitalarias. Específicamente la detección fenotípica de las carbapenemasas, ha sido un reto para los laboratorios de microbiología, debido principalmente a que las técnicas empleadas de rutina como los paneles o tarjetas de sensibilidad para equipos automatizados o incluso la prueba de difusión con discos (Kirby-Bauer), pueden presentar resultados de sensibilidad “in vitro” frente a carbapenémicos, aun cuando el microorganismo sea capaz de producir esta enzima. Por esta razón se requiere la utilización de pruebas adicionales como el Test

Modificado de Hodge (TMH) o las sinergias con ácido fenil borónico (AFB) y EDTA, las cuales requieren de una lectura interpretada del antibiograma y experticia técnica, para discriminar los resultados, demorando el reporte de los resultados. Aunque también existen métodos moleculares para la caracterización completa de las carbapenemasas, aun no es factible su utilización en los laboratorios clínicos, que son en últimas los encargados de reconocerlas e informarlas.

En Colombia, los datos disponibles de resistencia antimicrobiana en bacterias de importancia hospitalaria, se empezaron a generar desde grupos de investigación en diferentes ciudades de país, dentro de las que se encuentran, el Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana en Bogotá (GREBO), el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigación Médica (CIDEIM), la Red de Vigilancia Epidemiológica de Resistencia Nosocomial del Valle (RENOVA) y el Grupo para el estudio de la resistencia a antimicrobianos en Medellín (GERMEN). En el año 2010 el Instituto Nacional de Salud, constituyo el grupo de vigilancia de las infecciones asociadas al cuidado de la salud (IAACS) que canaliza entre otros datos, información de resistencia bacteriana a nivel nacional {Villalobos Rodríguez et al., 2011} Algunos de estos grupos de investigación, ya han reportado la presencia de enzimas tipo carbapenemasas KCP-2 y KCP-3, circulando en hospitales de tercer nivel en diferentes ciudades del país {Pacheco R et al., 2014} {Villalobos AP, 2014} {Hernández-Gómez C et al., 2014}. {Saavedra SY et al., 2014}

En el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, como parte de la actividad de vigilancia de la resistencia el grupo GREBO recibe y caracteriza aislamientos de microorganismos con perfiles inusuales de resistencia, de las cuales se caracterizaron *K. pneumoniae* productoras de KPC-3, recuperadas en hospitales de Bogotá entre los años 2008 a 2010. El objetivo de este trabajo fue determinar las características genéticas de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, productores de carbapenemasa tipo KPC-3, recuperados de procesos infecciosos, en hospitales de Bogotá entre los años 2008 al 2010.

Se estudiaron 82 aislamientos de *K. pneumoniae* remitidos a GREBO, la determinación de perfiles de sensibilidad antimicrobiana se realizó utilizando técnicas de microdilución en caldo, E-Test y difusión de disco. La detección fenotípica de enzimas que confieren resistencia a cefalosporinas y carbapenémicos, se determinó por sinergia de doble disco

para Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), test de Hodge y sinergia con Ácido Fenil Borónico (APB). Para determinar relaciones clonales se realizó Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE por su nombre en inglés Pulsed Field Gel Electrophoresis). Posteriormente se seleccionaron 6 aislamientos, de acuerdo a sus características de clonalidad, a los cuales se les determinó el Tipo de Secuencia (ST por su nombre en inglés Sequence Type) con la técnica Tipo de Secuencia de Múltiples Locus (MLST por su nombre en inglés Multilocus Sequence Type). Además estos aislamientos también fueron caracterizados mediante PCR para detección de betalactamasas BLEE, integron clase I, metilasas, acetilasas y plásmidos que confieren resistencia a fluoroquinolonas. Así mismo se estudió la presencia de porinas (*OmpK 35*, *OmpK 36* y *OmpK 37*) y se realizó secuenciación para determinar el contenido de genes corriente arriba del gen *blaKPC-3*.

Este trabajo corresponde a la caracterización genética y al primer seguimiento de la diseminación de aislamientos clínicos portadores de KPC-3 en Bogotá en un periodo de tres años. Demostrando la permanencia de estos aislamientos por varios años, en diferentes hospitales de la ciudad y el éxito de este tipo de microorganismos para diseminarse en nuestro ambiente hospitalario. Se logró identificar que las instituciones participantes cuentan con la capacidad técnica para realizar la identificación bacteriana, determinación de perfiles de susceptibilidad y algunas pruebas de tamizaje de enzimas; que se debe trabajar para realizar la implementación de pruebas confirmatorias que permitan detectar la presencia de carbapenemasas y que el apoyo de laboratorios de referencia para estudios de caracterización molecular puede aportar de forma significativa en el análisis, tipificación, caracterización de brotes y detección de clones epidémicos y de la diseminación local de microorganismos resistentes.

La contribución de este trabajo se puede apreciar desde varios niveles, el primero hace referencia al cumplimiento del objetivo general que permite tener conocimiento específico de las características genéticas de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC-3 recuperados en hospitales de Bogotá, adicionalmente se obtuvieron estandarizaciones de técnicas de biología molecular que se constituyen en una herramienta para los laboratorios que requieran su aplicación y por último se obtiene una colaboración entre instituciones nacionales e internacionales, que contribuirán a futuras investigaciones en el tema.

Objetivo general

Determinar las características genéticas de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, productores de carbapenemasa tipo KPC-3, recuperados de procesos infecciosos, en 10 hospitales de Bogotá entre los años 2008 al 2010.

Objetivos específicos

- Determinar las relaciones genéticas y las genotípicas tipo de secuencia ST de aislamientos de *K. pneumoniae* productores de KPC-3 recuperados de diferentes hospitales de Bogotá.
- Caracterizar el entorno genético del gen *bla*_{KPC-3} en aislamientos, pertenecientes a diferentes grupos clonales.
- Comparar las características genéticas determinadas anteriormente, con los niveles de resistencia expresados por los aislamientos frente a carbapenémicos

1. Capítulo Marco Teórico

Los carbapenémicos actualmente son los antibióticos más ampliamente utilizados como tratamiento de elección contra microorganismos con múltiple resistencia. La producción de enzimas que son capaces de hidrolizar los antibióticos es el mecanismo de resistencia más común para esta clase de antimicrobianos en bacterias Gram negativas clínicamente importantes. Reportándose más frecuentemente las betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Teniendo en cuenta que las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos están incluidos dentro de los principales tratamientos para enfermedades infecciosas, la presencia y caracterización de estas enzimas, reviste gran importancia para la selección de terapia apropiada {Srinivasan and Patel, 2008}.

1.1 Clasificación de las betalactamasas:

La clasificación de las betalactamasas se basa tradicionalmente en sus características funcionales o estructura primaria, teniendo en cuenta la secuencia de proteínas se establecen cuatro grupos, A, B, C, y D. Dentro de esta clasificación se encuentran las carbapenemasas, enzimas capaces de hidrolizar la mayor parte de betalactámicos incluidos los carbapenémicos, las de clase B o metalo-betalactamasas por ejemplo VIM o IMP no presentan actividad frente a aztreonam y su acción es inhibida con EDTA. Las de clase D tienen actividad frente a oxacilinas, la OXA-48 es la más frecuentemente reportada y por último las clase A, que suelen ser sensibles a la acción del ácido clavulánico y presentan una menor actividad frente a meropenem que a imipenem, de estas la KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) es la más ampliamente diseminada en todo el mundo en sus variantes KPC-2 y KPC-3 {Bush and Jacoby, 2010}.

1.2 Descripción de las carbapenemasas tipo KPC

Hidrolizan betalactámicos de todas las clases, nitrocefina, cefalotina, bencilpenicilinas, ampicilina y piperacilina son antibióticos siempre afectados en presencia de esta enzima. Característicamente tienen un alto potencial de diseminación debido a su localización en plásmidos transferibles, se han aislado de diferentes especies bacterianas, principalmente en las enterobacterias, como *K. pneumoniae*, microorganismo con alta capacidad para acumular y transferir determinantes de resistencia {Queenan and Bush, 2007}.

Estas enzimas se han asociado con grandes brotes de Gram negativos multirresistentes en hospitales en todo el mundo {Bradford et al., 2004}, {Leavitt et al., 2007}, {Naas et al., 2005}, {Villegas et al., 2007}, {Wei et al., 2006}, incrementándose el problema debido a las dificultades en el control de la infección por este microorganismo {Nadkarni et al., 2009}, {Bratu et al., 2005} y a las altas tasas de mortalidad. {Bratu et al., 2005}

El primer miembro de la familia KPC fue descubierto por el proyecto de ICARE (siglas de Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology) en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae* de Carolina del Norte en 1996. Este aislamiento era resistente a todos los antimicrobianos probados, pero las CIM de los carbapenémicos disminuían en presencia de ácido clavulánico, la actividad de la primera carbapenemasa detectada fue asociada a un plásmido de 50Kb que codifica para la betalactamasa denominada KPC-1. {Yigit et al., 2001}

El descubrimiento de KPC-1 fue rápidamente seguido por diferentes reportes de una variante de un aminoácido (S174G) KPC-2, a lo largo de la costa este de Estados Unidos presentándose en cuatro aislamientos con CIM para imipenem de 2 a 8 µg/mL. {Smith Moland et al., 2003}. {Yigit et al., 2003}. Sin embargo, en el año 2008 se presentó una corrección del primer reporte, del gen *bla*_{KPC-1} donde los autores indican que las variantes KPC-1 y KPC-2 son la misma enzima {Yigit et al., 2008}.

El gen productor de KPC-2 reside en un plásmido transferible, y se caracteriza porque todos los aislamientos presentan susceptibilidad disminuida a imipenem, pero ninguno era técnicamente resistente. Las regiones genéticas alrededor de este gen KPC-2 contienen tres marcos abiertos de lectura con homología de secuencia a las transposasas. Cuando se realizó ribotipificación, la mayoría de cepas productoras de KPC-2 eran clonales, incluso entre diferentes hospitales. Notablemente muchos de estos reportes describían inconsistencias en el reconocimiento de estas cepas como

resistentes a los carbapenémicos, porque las CIM eran menores que los puntos de corte aprobados en ese tiempo {Bradford et al., 2004}, {Bratu et al., 2005}, {Bratu et al., 2005}. Al tiempo con el incremento de los reportes de KPC-2, una variante extremadamente resistente KPC-3, fue detectada en el año 2000 en un brote de *K. pneumoniae* ocurrido en Nueva York {Woodford et al., 2004}. El análisis cinético de la enzima, reveló un perfil similar a KPC-1 y KPC-2, con un leve incremento en la velocidad de la hidrólisis de ceftazidima {Alba et al., 2005}. En 2006 emergió en Israel {Leavitt et al., 2007} encontrándose como genéticamente relacionada con los aislamientos productores de brotes en varios lugares de Estados Unidos pertenecientes al grupo clonal ST258, de la misma forma se ha reportado en China, Medio Oriente, Europa {Cai et al., 2008} {Cuzon et al., 2008} {Naas et al., 2005} y Suramérica incluyendo Colombia {Villegas et al., 2006}, {López et al., 2011}, {Guzman-Blanco et al., 2014}

El estudio de los primeros aislamientos portadores de KPC-3 en comparación con la variante KPC-2, mostro un cambio de 2 aminoácidos, con un peso molecular presumible de 28,503 y un punto isoeléctrico pI de 5.97, el gen bla_{KPC-3} fue localizado en un plásmido de 75kb, estos aislamientos no expresaban la porina *OmpK35*. Adicional a la resistencia a carbapenémicos también presentaban resistencia a cefalosporinas, penicilinas y aminoglucósidos {Woodford et al., 2004}

1.3 Epidemiología de carbapenemasas tipo KPC

La emergencia y diseminación de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos (KPRC) y otros tipos de ERC son consideradas un problema de salud pública, relacionado con resistencia antimicrobiana entre bacterias Gram-negativas y pone de manifiesto la necesidad inmediata para la implementación de estrategias efectivas de detección y control {Spellberg et al., 2008}. En las regiones donde este tipo de microorganismos es endémico, existe una mayor probabilidad para la importación de ERC y las instituciones deben considerar estrategias adicionales para reducir su frecuencia y diseminación, {Siegel et al., 2007} tales como establecer protocolos para detectar resistencia y producción de carbapenemasas y alertar de inmediato a epidemiología y al equipo de control de infecciones {Lledo et al., 2009}.

La mayoría de las infecciones y grandes brotes con ECR, ocurren cuando se requieren hospitalizaciones prolongadas, pacientes admitidos en UCI, comorbilidades asociadas,

pacientes que han tenido procedimientos invasivos y reciben o han recibido dosis de antibióticos de amplio espectro particularmente carbapenémicos {Won et al., 2011} {Endimiani et al., 2009}. De acuerdo con un reporte de Red Nacional de Seguridad en Salud (NSHN National Healthcare Safety Network) de los CDC el 17,8% de las infecciones con ECR son reportadas en centros de salud con hospitalizaciones prolongadas; frente a (<5%) de las reportadas en centros de salud que no incluyen estancias prolongadas {Centers for Disease Control and Prevention, 2013}.

Las infecciones en comunidad pueden ocurrir, sobretodo, porque los pacientes que han estado en centros de atención medica por largo tiempo, se pueden establecer como reservorios o portadores y pueden transmitir estos microorganismos cuando entran o son remitidos a instituciones de salud ambulatorias. Para controlar o mitigar esta situación, en países como Israel, se han implementado medidas como la obligatoriedad de la vigilancia activa para portadores de ERC en pacientes con algún grado de riesgo, antes de ser remitidos a otra institución, o en el momento mismo de su internación {Munoz-Price et al., 2013}.

No obstante las personas no son los únicos reservorios de este tipo de microorganismos, se ha demostrado la presencia de ERC en aguas residuales de los hospitales, convirtiendo a los afluentes hídricos en potenciales fuentes de contaminación. {Zhang et al., 2012} {Picao et al., 2013}

En respuesta a esta situación los centros para el control de las enfermedades (CDC por su nombre en inglés Control Disease Centers) y el Comité Asesor de Prácticas de Control de Infecciones de Cuidado de la Salud (HICPAC por su nombre en inglés Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee), publicaron una guía para el control de las infecciones producidas por este tipo de microorganismos. {Lledo et al., 2009} cuya actualización en 2012 hace énfasis en la necesidad de coordinar esfuerzos regionales de control, especialmente cuando se vean implicadas varias instituciones hospitalarias. {Centers for Disease Control and Prevention, 2013}

1.3.1 Diseminación de las carbapenemasas tipo KPC en el mundo:

- **Europa**

Reino Unido e Irlanda: la primera enzima conocida en UK fue KPC-4 en un *Enterobacter sp* recuperado de un hemocultivo en Escocia en 2003 {Livermore et al., 2008}, cuatro años después se reportaron las primeras KPRC con perfiles de PFGE, similares a las reportadas en Israel {Woodford et al., 2008}

Durante 2008 y 2009 se confirmaron 18 aislamientos en pacientes que viajaron a Grecia o Israel todos pertenecientes al genotipo ST258 {Health Protection Report, 2013}. Este panorama cambio en 2010 cuando se presentaron 231 aislamientos portadores de KPC, considerándose que este brote fue resultado de la transferencia horizontal de plásmidos, más que a la diseminación de un clon, muchos de estos aislamientos eran sensibles a fluoroquinolonas y aminoglucósidos, en contraste con el genotipo ST 258 que característicamente es susceptible in vitro solo a colistina tigeciclina y gentamicina {Livermore, 2012}. En esta región el ST 258 continúa siendo importado y no ha causado ningún brote sustancial. En Irlanda la primera enzima KPC fue identificada en febrero de 2009 y posteriormente en 2010 se aisló en 6 pacientes de diferentes servicios en el mismo hospital. Todos los aislamientos, eran genotipo ST258 aunque presentaban diferencias en los perfiles electroforéticos por PFGE {Morris et al., 2012}.

España y Portugal: en 2009 se presentó el primer aislamiento de KPC-3 en *K. pneumoniae* en Madrid, aquí a diferencia de lo descrito en otras partes de mundo, los aislamientos tenían los ST384 y ST388 y los pacientes no tenían historial de viaje a lugares con antecedentes de epidemia {Curiao et al., 2010}. Un análisis reciente, muestra que las carbapenemasas de tipo KPC se encuentran en el tercer lugar de frecuencia en aislamientos clínicos en España {Oteo et al., 2013}. Portugal no ha reportado infecciones clínicas por ERC pero si se han encontrado cepas de *E.coli* KPC-2 en aguas de río {Poirel et al., 2012}

Francia: en este país los primeros aislamientos de KPRC se relacionaron con pacientes que habían viajado a zonas endémicas. El primer caso reportado fue en el año 2005 en un aislamiento de *K. pneumoniae* KPC-2, recuperado de un paciente con antecedente de estadía en un hospital de Nueva York 3 meses antes {Naas et al., 2005}. En el mismo

año se encontró un *Enterobacter cloacae* KPC-3 recuperado de un absceso abdominal de un paciente al que le habían practicado una gastrectomía, igual que el primer caso, en un hospital de Nueva York {Dortet et al., 2008}. Un reporte de 2008 describe nuevamente un aislamiento de *K. pneumoniae* KPC-2 en un paciente transferido de un hospital de Grecia, este reporte se constituyó como el primero en demostrar la diseminación internacional de KPC desde Grecia {Cuzon et al., 2008}. En 2011 se encontró una *E.coli* en con sensibilidad disminuida a carbapenémicos en un paciente transferido de India {Potron et al., 2012}.

El primer aislamiento no importado se reportó en una *E. coli* con KPC-2 y ST131, de un paciente que había tenido tratamiento previo con imipenem por una infección de vías urinarias {Naas et al., 2011}.

Para el año 2012 se estableció una vigilancia de todas las carbapenemasas, en 7 meses se identificaron 15 aislamientos con KPC-2 y 5 KPC-3 que correspondían al 12,5% de todos los aislamientos de ERC; 5 de los 20 estaban ligados a viajes recientes a Israel, Italia, Kuwait y China, ninguno fue adquirido en comunidad, y muchos eran colonización {Munoz-Price et al., 2013}.

Italia: dos sistemas de vigilancia alternos en el país reportan un incremento de KPRC de <2% entre 2006 y 2009, hasta un 30% en 2011{European Center for Disease Prevention and Control, 2013}; y de 2% en 2009 a 19% en 2012 {Sisto et al., 2012}.

Cronológicamente el primer aislamiento reportado fue una *K. pneumoniae* KPC-3 en 2008 {Giani et al., 2009}, seguido en 2009 por dos KPC-2 en pacientes sin antecedentes de viajes a zonas endémicas {Fontana et al., 2010}. Datos de la vigilancia de un hospital en Padua entre 2009 y 2011, identificaron casi 200 casos de KPC-3 ST258 y KPC-2 ST14 {Richter et al., 2012} {Mazzariol et al., 2012}. En 2011 se describió la transferencia horizontal de resistencia a colistina en aislamientos KPC positivos, recuperados en paciente internados en diferentes servicios de un mismo hospital {Mammìna et al., 2012}.

Grecia: países como Francia y Suecia reportan aislamientos relacionados con viajes desde este país, propiamente en Grecia se reporta un brote de *K pneumoniae* KPC-2 en un hospital en Creta {Maltezou et al., 2009}. Este tipo de mecanismo de resistencia, se ha diseminado en los centros de atención griegos, donde no hay estancias prolongadas {Zarkotou et al., 2011}, diferente a lo que sucede en Estados Unidos, donde la mayor

frecuencia de aislamientos se reporta en los centros de atención que tiene servicios de hospitalización.

Datos de vigilancia epidemiológica, reportan un 38% de enzimas tipo KPC en aislamientos de *K. pneumoniae* recuperadas de hemocultivos. La mayoría de los aislamientos está relacionado con el ST-258 aunque todavía es la cepa dominante, también se han identificado otros linajes que ahora llevan la enzima KPC {Giakoupi et al., 2009}, {Giakkoupi et al., 2011}.

Israel: *K. pneumoniae* genotipo ST258 es predominante en este país, probablemente importada de Estados Unidos, el cual empezó a diseminarse en los hospitales de Israel a finales de 2005, para 2007 la incidencia mensual de nuevos casos era de 41.9 por 100000 pacientes/día. El ministerio de salud en 2007 puso en marcha una medida de intervención nacional la cual rápidamente disminuyó la incidencia de este mecanismo de resistencia en un 79% para mediados de 2008 {Schwaber et al., 2011}.

- **Asia**

India: los primeros aislamientos productores de KPC fueron recuperados en aislamientos de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Proteus mirabilis* {Jones et al., 2009}. Desde 2007 a 2010, se encontraron 9 pacientes adicionales que portaban enzimas clase KPC-2 y KPC-3, uno de los aislamientos coproducía 5 clases diferentes de betalactamasas y *rmfB*, que confiere resistencia a los aminoglucósidos {Kumarasamy and Kalyanasundaram, 2012}. Exceptuando lo anterior la enzimas tipo KPC no son tan frecuentes en este país como New Delhi Metalobelactamasas (NDM) y las enzimas tipo OXA-48 {Castanheira et al., 2011}.

China: el primer aislamiento se presentó en 2004 {Wei et al., 2007}, KPC-2 es variante más común, y *K. pneumoniae* ST11 se consideran como la especie de ERC y el clon más predominantes en este país {Qi et al., 2011}.

Australia y Nueva Zelanda: en estos países, menos del 1% de las enterobacterias adquiridas en el hospital, portan enzimas KPC y los casos reportados están asociados a pacientes con historia de viajes a lugares endémicos; o que han compartido habitaciones con personas portadoras de estos microorganismos {Munoz-Price et al., 2013}.

- **Norte América:**

Estados Unidos: en Carolina del Norte se reportó el primer aislamiento de productor de carbapenemasa KPC-1 en 1996 {Yigit et al., 2001} desde 1997 a 2001 se recuperaron aislamientos en hospitales en Nueva York y en el noreste del país {Bradford et al., 2004}, {Bratu et al., 2005}, {Pope et al., 2006}, {Chiang et al., 2007}.

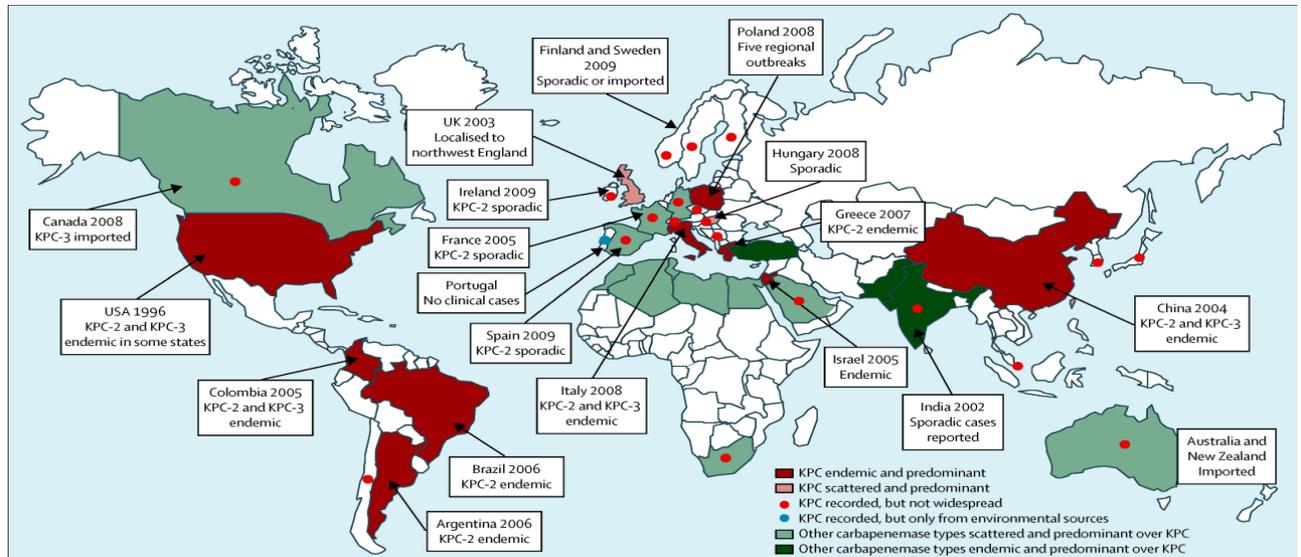
Actualmente la presencia de microorganismos productores de KPC se ha reportado en 47 de los 50 estados. {Centers for Disease Control and Prevention, 2013}.

En este país los viajeros internacionales no se han considerado como un factor de riesgo para la adquisición de KPC, la ST258 ha sido identificada como la más frecuente {Kitchel et al., 2009} y su presencia no se ha limitado a las enterobacterias, también se han encontrado en *Pseudomonas sp* {Bennett et al., 2009} {Poirel et al., 2010}.

Canadá: se han reportado pocos aislamientos todos pertenecientes al ST258 el primero en 2008 de un paciente inmunocomprometido sin antecedentes de viaje a zonas endémicas {Pillai et al., 2009}, posteriormente se describieron 3 pacientes con KPC-3, los cuales habían viajado a Estados Unidos {Goldfarb et al., 2009}, el tercer reporte fue de KPC-2- en un paciente con antecedentes de viaje a Grecia {Chan et al., 2013}. El programa de vigilancia de infecciones nosocomiales canadiense (Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program) ha recuperado aislamientos KPC-3 en cuatro *K. pneumoniae*, una *Escherichia coli*, una *Klebsiella oxytoca* una *Serratia marcescens*, todos del mismo hospital. {Mataseje et al., 2012}

La figura 1-1 se tomó de una revisión del año 2013 donde los autores enmarcan la epidemiología clínica de las carbapenemasas incluyendo KPC {Munoz-Price et al., 2013}, el mapa muestra los tipos de presentación, de las carbapenemasas en el mundo, encontrándose, en niveles endémicos en América y algunos países de Asia, o como casos esporádicos pero no diseminados y también su presentación en fuentes ambientales.

Figura 1-1. Características epidemiológicas de los productores de KPC por país de origen.



Fuente: Lancet Infect Dis. 2013 Sep 13(9) 785-96.

- **Sur América:**

Datos generados por el programa de vigilancia internacional (SENTRY **Antimicrobial Surveillance Program**) iniciado en 1997 para monitorear los perfiles de sensibilidad antimicrobiana en patógenos causantes de infecciones asociadas al cuidado de la salud e infecciones comunitarias, muestran que en Argentina y Brasil se ha presentado un incremento en bacterias con KPC desde el año 2008 {Gales et al., 2012}.

Específicamente en Argentina, el primer aislamiento reportado de una KPC-2 fue en el año 2006 en un paciente sin antecedentes de viaje a zonas endémicas {Pasteran et al., 2008}, en esta oportunidad el laboratorio de referencia para Latinoamérica, en resistencia antimicrobiana con sede en el Instituto Carlos G Malbran de Buenos Aires, diseñó un algoritmo para detectar carbapenemasa clase A en los laboratorios de la red de vigilancia {Pasteran et al., 2009}. Esta vigilancia muestra aislamientos esporádicos hasta mitad de 2009, donde se presentó una diseminación de un clon ST258 {Gomez et al., 2011}.

En Brasil la primera identificación fue también en el año 2006 en cuatro aislamientos de *K. pneumoniae* de diferentes pacientes en la UCI de un hospital en Recife, los aislamientos fueron KPC-2 y pertenecían al ST337 {Monteiro et al., 2009} {Ribeiro et al., 2013}.

- **Colombia:**

El mecanismo de resistencia a carbapenémicos mediado por enzimas tipo KPC se constituye como endémico en nuestro país {Pacheco R et al., 2014}, la rápida diseminación de este mecanismo de resistencia, se empezó a determinar en 2009 cuando se reveló la presencia de KPC en 3 de las 7 áreas metropolitanas estudiadas {Mojica et al., 2012}.

En 2005 se encontraron los primeros aislamientos de *K. pneumoniae* que portaban la enzima KPC-2, ninguno de los pacientes había tenido antecedentes de viajes a regiones endémicas {Villegas et al., 2006}. Posteriormente se reportan brotes de KPC-3 en diferentes ciudades del país, incluyendo Bogotá {Saavedra SY, 2010}, {Saavedra SY et al., 2010}, en uno de ellos, se rastreó el caso índice hasta un paciente que había viajado desde Israel {Lopez et al., 2011}.

Colombia fue el primer país en el mundo en reportar la presencia de KPC en *Pseudomonas aeruginosa* en el año 2006, aislada en tres pacientes de un mismo hospital de la ciudad de Medellín {Villegas et al., 2007}. Una publicación más reciente del Grupo de Microbiología del INS, reporta en un periodo de 6 meses (septiembre de 2012 a marzo de 2013) una prevalencia de 4,5% de enzimas KPC en *P. aeruginosa* {Saavedra SY et al., 2014}.

Los genotipos ST encontrados en aislamientos portadores de KPC han sido ST258 y ST512 en *K pneumoniae* {Mojica et al., 2012} y ST308, ST235, ST1006, y ST1060 en *P. aeruginosa* {Cuzon et al., 2011}.

1.4 Características genéticas de carbapenemasas tipo KPC

Naas y colaboradores en 2008 {Naas et al., 2008}, identificaron un nuevo transposon al que denominaron Tn4401 y designaron como el responsable de la adquisición y la diseminación del gen *bla*_{KPC}. Este nuevo elemento contiene un gen que codifica para una transposasa, (*tnpA*) una resolvasa (*tnpR*), el gen *bla*_{KPC} y dos secuencias de inserción (ISs por su nombre en inglés), IS*Kpn6* e IS*Kpn7*.

IS*Kpn6* pertenece a una nueva familia de ISs, la IS1182, y se encuentra inmediatamente corriente abajo del gen *bla*_{KPC}, presenta una longitud de 1540-pb y su transposasa

putativa tiene 439 aminoácidos; las repeticiones invertidas (IR por su nombre en inglés) tienen una longitud de 17pb y esta transposición genera un sitio blanco de duplicación (TSD por su nombre en inglés target site duplication) de 2pb TA.

ISKpn7, es miembro de la familia IS21, se encuentra corriente arriba del gen *bla_{KPC}* y tiene una longitud de 1956pb y codifica para dos ORF (open reading frame) consecutivos designados *istA* un marco grande corriente arriba e *istB*, un marco más pequeño corriente abajo, *istA* codifica una transposasa putativa de 341 aminoácidos y *istB* codifica para una proteína que ayuda a la transposición, de 259 aminoácidos. Las IRs de *ISKpn7* tiene una longitud de 28pb y esta transposición genera TSD de 3pb TAA.

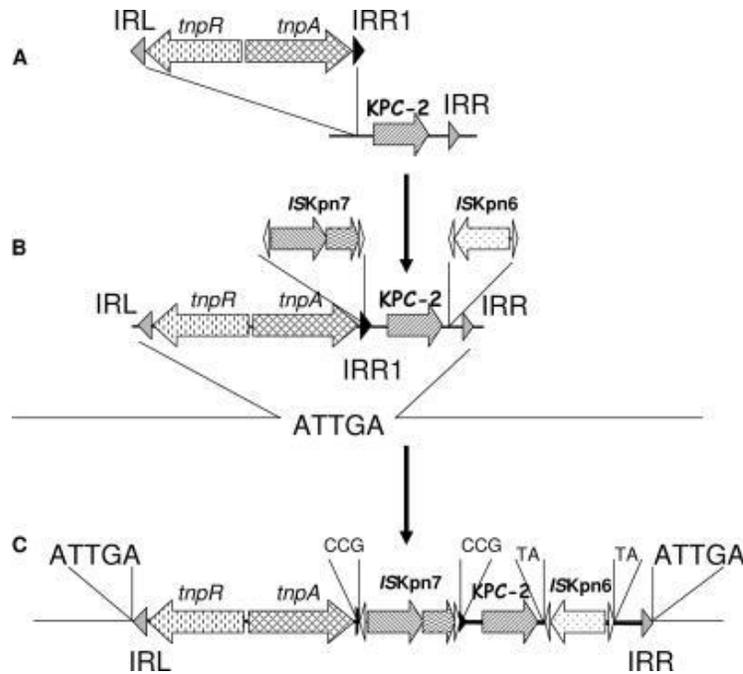
El análisis detallado de las secuencias localizadas a ambos lados de la *ISKpn7* revelan la presencia de una segunda IR de 39-pb denominada IRR1 (IR Right) la cual es interrumpida por la inserción de *ISKpn7*. La secuencia de IRR1 es 80% idéntica a la de IRL, igualmente las secuencias de IRL e IRR son 80% idénticas. De esta manera se postula que un transposon que contenía *tnpA* y *tnpR* pudo haberse insertado corriente arriba del gen *bla_{KPC}* posteriormente *ISKpn6* e *ISKpn7* se insertaron corriente abajo del gen *bla_{KPC}* respectivamente {Naas et al., 2008}.

La inserción de *ISKpn7* permite la interrupción de IRR por IRR1 del transposon, forzando así a la transposasa a reconocer una segunda repetición invertida derecha localizada más lejos corriente abajo del gen *bla_{KPC}*. El nuevo transposon formado tiene la capacidad de mover el gen *bla_{KPC}* desde su posición inicial a varios sitios del plásmido.

En la caracterización de estos elementos genéticos, se observó que algunos tenían una deleción de 100pb corriente arriba del gen *bla_{KPC}* convirtiéndose en la isoforma **a** del Tn4401, que difiere en 100-pb, la isoforma **b** correspondiente a la que no tiene la deleción. Sin embargo se ha reportado una secuencia con una deleción de 200-pb en la misma localización genética, sugiriendo que esta región puede ser altamente polimórfica, o genéticamente inestable. (GenBank accession no. DQ989640).

La figura 2-1, esquematiza como las *ISKpn6* e *ISKpn7*, han contribuido al origen y movilización del Tn4401.

Figura 2-1, Origen y adquisición de elementos genéticos móviles del Tn4401.



(A) Inserción corriente arriba de un gen *bla_{KPC}* en un transposon de la familia Tn3 delimitado por IRL y IRR1; (B) inserción de *ISKpn6* e *ISKpn7*, el cual interrumpe IRR1; (C) otra IRR localizada corriente abajo del gen *bla_{KPC}* e IRL son reconocidas por la transposasa, promoviendo la escisión de Tn4401, el cual puede ser insertado en una nueva secuencia blanco.

Fuente: Antimicrob Agents Chemother. 2008 April; 52(4): 1257–1263. Published online 2008 January 28. doi: 10.1128/AAC.01451-07

1.5 . Diagnóstico microbiológico de carbapenemasas tipo KPC

La detección de este tipo de enzimas es un tema crucial en el control de infecciones, debido a que están codificadas principalmente en elementos genéticos de tipo transferible como plásmidos, los cuales a su vez pueden portar genes asociados con resistencia a otros antibióticos y que tienen la capacidad de ser adquiridos por patógenos naturalmente resistentes como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. {Thomson, 2010}

1.5.1 Perfiles de sensibilidad frente a carbapenémicos:

En el año 2009, el Instituto de CLSI recomendó que las enterobacterias susceptibles a los carbapenémicos que tuvieran CIM para ertapenem de 2 µg/mL; meropenem entre 2 – 4 µg/mL e imipenem entre 2 – 4 µg/mL, o diámetros de inhibición para ertapenem de 19-21 y meropenem de 16 a 21 mm, deberían ser caracterizadas por el Test Modificado de Hodge (TMH) {Wayne, 2009} si esta prueba daba un resultado positivo, se demostraría la presencia de estas enzimas y deberían ser informadas a los clínicos y al grupo de control de infecciones.

El reporte de la susceptibilidad de los carbapenémicos es un tema importante en el laboratorio de microbiología y en el control de infecciones ya que se ha demostrado efectividad de la terapia combinada para el tratamiento de microorganismos productores de carbapenemasas, {Daikos et al., 2009}, {Weisenberg et al., 2009}.

Sin embargo el CLSI en su actualización del año 2010 consideró que no era importante la detección de rutina de las carbapenemasas, en vez de esto disminuyó los puntos de corte para estos antibióticos, sugiriendo que de esta manera se podrían obtener terapias efectivas independiente del mecanismo de resistencia {Wayne, 2010}. Según algunos autores esta aproximación puede ser peligrosa, para los pacientes, ya que no hay datos convincentes para justificar los resultados terapéuticos de aislamientos productores de carbapenemasas como sensibles a los carbapenémicos {Thomson, 2010}.

Se ha demostrado que pacientes colonizados con KPRC han sido transmisores durante brotes de infecciones asociadas al cuidado de la salud {Schwaber et al., 2008} en estos brotes se ha demostrado que la detección temprana del mecanismo de resistencia, así como la introducción de medidas estrictas de control pueden ayudar a controlar la diseminación de este patógeno {Patel et al., 2008}, {Samra et al., 2007}, {Calfée and Jenkins, 2008}.

Aunado a lo anterior se resalta la demostración de la diseminación epidémica de KPC, y las consecuencias adversas que esto puede llegar a causar, cuando los laboratorios fallan en la rápida detección de microorganismos productores de carbapenemasas {Elemam et al., 2009}.

1.5.2 Detección fenotípica de enzimas:

Las pruebas para la detección KPC en el laboratorio, han ido evolucionando; la principal dificultad para su diagnóstico, es el hecho de que algunas cepas que contienen el gen *bla_{KPC}* presentan una CIM elevada, pero continúan en el rango de susceptibilidad para carbapenémicos. Debido a que estas cepas se clasifican como susceptibles no son identificadas como riesgo potencial para el control de infecciones {Walsh et al., 2005}, {Queenan and Bush, 2007}. La producción de carbapenemasas se debe sospechar incluso cuando no hay franca resistencia, pero si una susceptibilidad disminuida a carbapenémicos y debe ser confirmada con pruebas adicionales.

Dentro de pruebas de laboratorio más utilizadas y que presentan mayor especificidad están; el Test Modificado de Hodge (TMH) recomendado por el CLSI, recientemente se ha descrito un test acidimétrico usando un carbapenémico como substrato de detección {Nordmann et al., 2012}, Así mismo, la inclusión en el antibiograma de rutina de inhibidores como ácido fenil borónico para KPC y EDTA o ácido dipicolínico, para metaloenzimas ayudan a discriminar entre diferentes tipos de carbapenemasas {Pournaras et al., 2010}.

La técnica MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight) está disponible en los laboratorios clínicos que tengan la capacidad de adquirirla, para identificación bacteriana. Sin embargo ha sido eficientemente probada con fines de investigación, para la detección de carbapenemasas. Así como también para determinar el grado de hidrólisis de cada cepa frente a carbapenémicos específicos {Hrabak et al., 2012}.

1.5.3 Caracterización genotípica de aislamientos con carbapenemasas tipo KPC

Los métodos moleculares para la caracterización epidemiológica de aislamientos de *K. pneumoniae* incluyen RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), PFGE y AFLP (amplified fragment length polymorphism), estos métodos son utilizados en laboratorio a nivel local principalmente para la investigación de brotes, otros métodos utilizados son la ribotipificación el cual es altamente reproducible y muestra alta discriminación en aislamientos de *Klebsiella* cuando se utiliza la enzima *EcoRI*.

Se ha considerado PFGE, como una de las técnicas que provee excelente discriminación aunque tiene la limitante de la complejidad en la estandarización en el laboratorio y su

costo elevado, se emplea en un amplio rango de especies bacterianas {Ribot et al., 2006}. Un hecho importante para entender la epidemiología molecular es que cuando se encuentran diferentes tipos de PFGE en un mismo grupo clonal, indica selección independiente a partir de un ancestro común, más que una simple diseminación. {Higgins et al., 2010}

La técnica MLST, es un método basado en la secuenciación de genes generalmente conservados, adecuada para caracterizar relaciones genéticas entre aislamientos bacterianos, En general se usan las porciones internas de siete genes esenciales de única copia. Esta técnica provee datos que permiten la implementación de bases internacionales de múltiples usuarios, específicamente para el patógeno de interés en este trabajo *K. pneumoniae*. El Instituto Pasteur (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>) tiene una base de datos de acceso público, donde se pueden consultar las secuencias tipo y los datos de los aislamientos que sean sometidos al análisis con la base de datos. El objetivo de estas bases de datos es proveer un lenguaje común, a nivel mundial, para la tipificación bacteriana, epidemiología y evolución de cepas microbianas {Jolley et al., 2004}

En 2005 se estableció un esquema de MLST para *K. pneumoniae*, donde originalmente se identificaron 40STs entre 67 aislamientos {Diancourt et al., 2005}, en este trabajo los autores concluían que la resistencia es un problema de emergencia de múltiples clones, más que de la diseminación de unos pocos. La base de datos para *K. pneumoniae* incluye 542 STs dentro de los que se identifican la diseminación internacional de ciertos STs, particularmente los asociados a cepas productoras de carbapenemasas.

Se conoce que el ST de *K. pneumoniae* asociado con la producción de carbapenemasas es ST258 {Kitchel et al., 2009} {Navon-Venezia et al., 2009} considerado como predominante en el mundo, característicamente presenta sensibilidad a colistina y gentamicina, no obstante también se ha encontrado relacionado con otro tipo de enzimas por ejemplo CTX-M-14 en Asia {Ko et al., 2010} sugiriendo que no se restringe a las KPC. Así mismo se han reportado otros STs en *K. pneumoniae* relacionados con la presencia de enzimas tipo betalactamasas, en Estados Unidos STs 14, 21, 37, 45, 101, 228, 234, 257 y 259 {Kitchel et al., 2009} y en Israel STs 277, 327, 340 y 376 {Leavitt et al., 2010}

1.6 Antecedentes

En el pasado decenio se ha producido un dramático aumento en todo el mundo de la difusión de microorganismos multirresistentes. El tratamiento de las principales enfermedades infecciosas, como la tuberculosis, la neumonía y el paludismo, resulta cada vez más difícil y costoso, pues los microbios desarrollan resistencia a muchos de los medicamentos disponibles. La resistencia a los antimicrobianos está en aumento, amenazando nuestra capacidad de tratar algunas de las enfermedades infecciosas más mortíferas.

Las enfermedades infecciosas provocan todavía el 45% de las defunciones en los países de bajos ingresos y casi una de cada dos muertes prematuras en todo el mundo. La mayoría de esas enfermedades (el 90% aproximadamente) se deben a no más de seis enfermedades: infecciones respiratorias agudas (principalmente neumonía), enfermedades diarreicas, VIH/SIDA, TB, paludismo y sarampión. La resistencia a los antimicrobianos amenaza actualmente nuestra capacidad de tratar con eficacia por los menos cuatro de esas infecciones: infecciones respiratorias agudas, enfermedades diarreicas, paludismo y TB.

De acuerdo al Informe Científico realizado por la Universidad Nacional en 2009 (no publicado), en Colombia, han sido diversos los esfuerzos para la vigilancia de microorganismos resistentes de alto impacto. Es así como, el Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud lidera desde 1994 los programas de vigilancia de los serotipos y susceptibilidad antimicrobiana de los patógenos causantes de la infección respiratoria aguda (IRA), meningitis bacteriana aguda (MBA), enfermedad diarreica aguda (EDA) e infección de transmisión sexual, como son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella* spp., *Shigella* sp. y *Neisseria gonorrhoeae*.

Para el año 2000, se da el inicio de redes de vigilancia de resistencia bacteriana, con la creación del Grupo para el Control de la Resistencia bacteriana en Bogotá (GREBO), el cual inicio la vigilancia a través de la base de datos WHONET de la OMS mediante la cual recolecto la información desde los laboratorios institucionales. En el año 2001, GREBO contaba con 8 entidades de tercer nivel adscritas, luego en el 2006 con 25 entidades de segundo y tercer nivel y actualmente hacen parte de su red más de 30 instituciones de diferentes partes del país.

Ya en el 2005, con el apoyo de GREBO dio inicio al sistema de vigilancia de resistencia bacteriana (SIVIBAC) en las instituciones prestadoras de salud del distrito. Así mismo la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá implementó una política, enmarcada en la resolución 073/2005, para prohibir la distribución de antibióticos sin prescripción con el fin de reforzar las acciones de control de la resistencia bacteriana en marcadores de alto impacto.

El Grupo para el estudio de la resistencia de los antimicrobianos en Medellín (GERMEN) ha recolectando información de trece instituciones hospitalarias de esa ciudad. Otros grupos a nivel regional, han realizado avances en la investigación en el campo de la resistencia antibacteriana como la Unidad de Genética y resistencia antimicrobiana (UGRA), la Universidad del Sinú y la Universidad de Cartagena.

En Cali, se encuentra el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigación Médica (CIDEIM), el cual desde 2002 creó una red de vigilancia a nivel nacional con aproximadamente 12 instituciones nivel III y IV. Este grupo de investigación ha venido liderando a nivel del país estudios de prevalencia y caracterización de la resistencia en Gram negativos. Como iniciativa de la Asociación Colombiana de Infectología y de CIDEIM, en el año 2009 se crea la Red de Vigilancia Epidemiológica de Resistencia Nosocomial del Valle (RENOVA), con el fin de consolidar la conformación de un grupo multidisciplinario e interinstitucional para afrontar de manera sistemática, integral oportuna y permanente la resistencia antimicrobiana en el sur occidente colombiano.

Algunos de los grupos mencionados arriba realizan divulgación de datos de perfiles de resistencia de los microorganismos de importancia hospitalaria, es así como en Julio de 2011, GREBO en su boletín número 3 alerta acerca de la resistencia en *K. pneumoniae* frente a carbapenémicos en servicios de UCI de adultos reportando resistencia a imipenem en 6,8% meropenem 7,9% y ertapenem 13%, mientras que en servicios de adulto no UCI se presentan valores de 5,7%, 7,1 % y 13% para imipenem, meropenem y ertapenem respectivamente. De la misma forma CIDEIM reporta datos que permiten evidenciar el incremento de la resistencia de *K. pneumoniae* a carbapenémicos, especialmente para ertapenem, en los hospitales adscritos a su red.

Lo anterior constituye evidencia de que en hospitales del país, este tipo de aislamientos con resistencia a carbapenémicos se encuentran frecuentemente y no solamente como casos aislados o productores de brotes esporádicos.

2. Capítulo Metodología

2.1 Generalidades

2.1.1 Tipo de estudio

Descriptivo.

2.1.2 Población y muestra

Se seleccionaron 82 aislamientos de *K. pneumoniae* caracterizados por PCR y secuenciación como productores de la enzima carbapenemasa tipo KPC-3, los cuales se encontraban conservados a -70°C, en el cepario del laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

2.2 Determinación de perfiles de sensibilidad antimicrobiana:

Se realizó por las técnicas de difusión con discos y microdilución; para los antibióticos ampicilina sulbactam (SAM), aztreonam (AZT), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ), cefotaxima (CTX), cefepime (FEP), amikacina (AK), gentamicina (GM), trimetoprim sulfametoxazol (SXT), tigeciclina (TIG), imipenem (IMI), meropenem (MER) y ertapenem (ERT) de acuerdo al documento titulado estándares para la realización de evaluaciones de sensibilidad antimicrobiana del año 2012 del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) {Wayne, 2012}.

2.2.1 Difusión con discos

Se basa en la formación de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de un disco de papel de filtro impregnado con el antibiótico a probar. Por esta técnica se evaluaron todos los antibióticos excepto tigeciclina.

- **Procedimiento**

- Para la preparación del inóculo se sembraron los aislamientos en agar Infusión Cerebro Corazón (BHI por su nombre en inglés Brain Heart Infusión) a 37 °C con un crecimiento de entre 18 y 24 horas
- Se realizó una suspensión en solución salina estéril, igual al tubo 0,5 de la escala de McFarland (1 a 2 X 10⁸ UFC) con un espectrofotómetro (Genesys 20) a una longitud de onda de 625nm, estableciendo como rango de densidad óptica DO entre 0,07 a 0,09.
- Se realizó la inoculación de las placas de agar Mueller Hinton, sin haber pasado más de 15 minutos desde la preparación de la suspensión, se sumergió un escobillón estéril y se inoculó el agar estriando el escobillón en tres direcciones diferentes para garantizar la distribución uniforme.
- Los discos se distribuyeron uniformemente asegurando que los halos no interfirieran con la lectura. Se invirtieron las placas de agar y se incubaron a 37°C por 18 a 24 horas.
- Una vez cumplido el tiempo de incubación, se realizó la medición de los halos de inhibición obtenidos para cada antibiótico utilizando una regla calibrada.

Interpretación de resultados

Los diámetros de los halos fueron comparados con la tabla 2A para *Enterobacteriaceae* del documento M-100-S22 del CLSI, donde se clasificaron los resultados en las siguientes categorías:

Susceptible: Esta categoría implica que los aislamientos son inhibidos por las concentraciones usuales con las dosis recomendadas dependiendo el sitio de la infección.

Intermedio: Estos aislamientos tienen CIM que son usualmente asequibles en sangre y tejidos, pero que son más bajas que los aislamientos susceptibles. Esta categoría implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde los fármacos son fisiológicamente concentrados o cuando se usan los antibióticos en concentraciones más altas de la dosis normal.

Resistente: Implica que los aislamientos no son inhibidos a las dosis usualmente usadas de los agentes antibacterianos con dosis normales, o tienen mecanismos específicos de resistencia determinados por sus características de CIM

Por la técnica de difusión con discos, también se realizaron pruebas fenotípicas para determinar la presencia de enzimas tipo Betalactamasa de Espectro Extendido (BLEE) por la prueba confirmatoria de doble disco con ácido clavulánico y la presencia de enzimas tipo carbapenemasas por el Test de Hodge Modificado (MTH *por su nombre en inglés Modified Hodge Test*) {Wayne, 2012, #2072}, así como la prueba de sinergia con meropenem y ácido fenil borónico como tamizaje de la expresión de carbapenemasas clase A, según lo establecido por el Instituto Nacional de Salud {Redes en Salud Pública Grupo de Microbiología, 2012, #97630}

2.2.2 Prueba confirmatoria de doble disco con ácido clavulánico para enzimas tipo betalactamasas de espectro extendido BLEE

- **Procedimiento**
- Se preparó una suspensión 0.5 McFarland de las aislamientos a evaluar.
- Se extendió el inóculo sobre la superficie del agar Mueller-Hinton siguiendo las recomendaciones del CLSI para las pruebas de rutina de difusión con disco.
- Se colocó un disco de CAZ y un disco de CAZ con ácido clavulánico (CAZ/CLA), otro disco de CTX y un disco de CTX con ácido clavulánico (CTX/CLA).
- Posteriormente se incubó a 35°C en aerobiosis durante 16-18 horas.

Se realizó el mismo procedimiento con las cepas:

K. pneumoniae ATCC® 700603 BLEE positiva.

E. coli ATCC® 25922 BLEE negativa.

Interpretación de resultados

Se realizó de acuerdo a la tabla 1 suplementaria de la tabla 2A del documento CLSI 2012

Positivo:

Una diferencia de ≥ 5 mm entre el diámetro producido por el disco con ceftazidima + ác. Clavulánico y el de ceftazidima solo o entre el disco de cefotaxima + ác. clavulánico y cefotaxima solo, se interpreta como presencia de una BLEE.

Negativo

Diferencia de < 5 mm entre el antibiótico solo comparado con el antibiótico con ácido clavulánico.

2.3 Test de Hodge modificado para la identificación de enzimas tipo carbapenemasas

- **Procedimiento:**
- Se preparó una suspensión 0.5 McFarland de la cepa de referencia *E. coli* ATCC® 25922, se realizó una dilución 1:10 en solución salina.
- Se extendió el inóculo sobre la superficie del agar Mueller-Hinton siguiendo las recomendaciones del CLSI para las pruebas de rutina de difusión en disco.
- Se colocó un disco de meropenem 10 μ g en el centro del agar, se tomó una colonia de un cultivo de 18 a 24 horas de los aislamientos y se estrío desde el borde del disco hacia la periferia.
- Posteriormente se incubó a 35°C en aerobiosis durante 16-18 horas.

Se realizó el mismo procedimiento con las cepas:

K. pneumoniae ATCC® BAA-1705—MHT positivo.

K. pneumoniae ATCC® BAA-1706—MHT negativo como control de calidad de la prueba.

Interpretación de los resultados:

Se realizó de acuerdo a la tabla 2 suplementaria de la tabla 2A del documento CLSI 2012 donde se establece:

Positivo: Un resultado positivo se evidencia por el crecimiento de la cepa ATCC de *E. coli* en la parte de intersección entre el halo de inhibición generado por la difusión del antibiótico y la estría de la cepa problema formando una hendidura en la parte proximal al

disco. Esto indicó la presencia de carbapenemasas en la cepa problema que son liberadas al medio y permiten el crecimiento de *E. coli*.

Negativo: No se presenta crecimiento de *E. coli* en el punto de intersección de la estría de la cepa problema y el halo de inhibición generado por el carbapenemasa

2.2.3 Prueba de Sinergia con ácido fenil borónico (APB) para el tamizaje de carbapenemasas clase A

- **Procedimiento:**
- Se preparó una suspensión 0.5 McFarland de las aislamientos a evaluar.
- Se extendía el inóculo sobre la superficie del agar Mueller-Hinton siguiendo las recomendaciones del CLSI para las pruebas de rutina de difusión con disco.
- Se colocó un disco de APB a 1,5 cm entre un disco de IMI y un disco de CAZ
- Posteriormente se incubó a 35°C en aerobiosis durante 16-18 horas.

Se realizó el mismo procedimiento con las cepas:

K. pneumoniae ATCC® BAA-1705— Sinergia positiva por presencia de enzima KPC-2.

K. pneumoniae ATCC® BAA-1706— Sinergia negativa por ausencia de enzima clase A.

Interpretación de los resultados:

Positivo: Un resultado positivo se evidencia por una sinergia o deformación de los halos en cualquiera de los dos antibióticos hacia el ácido borónico, indicaría la presencia de enzimas clase A.

Negativo: No se presenta sinergia o deformación de los halos.

2.2.4 Microdilución:

Se emplea para medir en forma cuantitativa la actividad *in vitro* de un agente antimicrobiano frente a determinado microorganismo, se trabajan volúmenes pequeños de caldo con diluciones específicas y conocidas de los antibióticos a evaluar

es la técnica utilizada para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) que corresponde a la concentración más baja del antimicrobiano que previene el crecimiento visible un microorganismo en agar o test de dilución en caldo. {Wayne, 2012, #2072}.

- **Procedimiento:**

Las CIM de los 82 aislamientos, se determinaron por los paneles y/o tarjetas de los equipos automatizados o semiautomatizados con los antibióticos en concentraciones conocidas, correspondientes a las marcas Microscan® (Siemens), Phoenix® (Beckton Dickinson) y Vitek® (Biomérieux), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Una segunda técnica microdilución en placa se aplicó únicamente a los seis aislamientos seleccionados para caracterización del entorno genético, utilizando los paneles previamente sensibilizados con concentraciones del antibiótico de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Sensititre TREK Diagnostic Systems, Westlake, OH),

Interpretación de los resultados:

La lectura de la CIM se realizó determinando la menor concentración del antibiótico que inhibió visiblemente el crecimiento bacteriano, las cuales fueron comparadas con la tabla 2A para *Enterobacteriaceae* del documento M-100-S22 del CLSI, donde se clasificaron los resultados en las siguientes categorías:

Susceptible: Esta categoría implica que los aislamientos son inhibidos por las concentraciones usuales con las dosis recomendadas dependiendo el sitio de la infección.

Intermedio: Estos aislamientos tienen CIM que son usualmente asequibles en sangre y tejidos, pero que son más bajas que los aislamientos susceptibles. Esta categoría implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde los fármacos son fisiológicamente concentrados o cuando se usan los antibióticos en concentraciones más altas de la dosis normal.

Resistente: Implica que los aislamientos no son inhibidos a las dosis usualmente usadas de los agentes antibacterianos con dosis normales, o tienen mecanismos específicos de resistencia determinados por sus características de CIM.

2.2.5 E-TEST:

Se utilizó la prueba E-test para determinación de la CIM frente a los 3 carbapenémicos evaluados (IMI, MER, ERT) de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Biomerieaux ®) así:

- **Procedimiento:**
- Se preparó una suspensión 0.5 McFarland de las aislamientos a evaluar.
- Se extendía el inóculo sobre la superficie del agar Mueller-Hinton siguiendo las recomendaciones del CLSI para las pruebas de rutina de difusión con disco.
- Se colocaron las tiras de E-Test.
- Posteriormente se incubó a 35°C en aerobiosis durante 18-24 horas.

Interpretación de los resultados:

La lectura de la CIM se realizó visualizando el punto de la tira (que representa la CIM), donde ya no se evidencia crecimiento bacteriano, que corresponde a la menor concentración del antibiótico que inhibió visiblemente el crecimiento bacteriano, las cuales fueron comparadas con la tabla 2A para *Enterobacteriaceae* del documento M-100-S22 del CLSI, donde se clasificaron los resultados en las siguientes categorías:

Susceptible: Esta categoría implica que los aislamientos son inhibidos por las concentraciones usuales con las dosis recomendadas dependiendo el sitio de la infección.

Intermedio: Estos aislamientos tienen CIM que son usualmente asequibles en sangre y tejidos, pero que son más bajas que los aislamientos susceptibles. Esta categoría implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde los fármacos son fisiológicamente concentrados o cuando se usan los antibióticos en concentraciones más altas de la dosis normal.

Resistente: Implica que los aislamientos no son inhibidos a las dosis usualmente usadas de los agentes antibacterianos con dosis normales, o tienen mecanismos específicos de resistencia determinados por sus características de CIM,

2.3 Determinación de las relaciones genéticas por técnicas de genotipificación estandarizadas

2.3.1 Electroforesis en gel con campo pulsado PFGE:

- **Procedimiento:**

Se realizó a los 82 aislamientos seleccionados utilizando 5 unidades (5U) de la enzima de restricción *XbaI* por cada bloque según protocolo estandarizado por la red PulseNet para *Salmonella*, *Shigella* y *E.coli*. {Ribot et al., 2006, #72085}. El protocolo completo desarrollado en este trabajo se encuentra como Anexo A.

Interpretación de los resultados:

La relación genética de los aislamientos clínicos, fue determinada por la diferencia en el número de bandas en los patrones de restricción {Tenover et al., 1995, #34094}. Los patrones de PFGE que se agruparon con una similaridad de más del 75% usando el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average) y el coeficiente Dice del programa GelCompar v 4.0 BioRad fueron consideradas como pertenecientes al mismo grupo clonal.

De acuerdo a los resultados obtenidos por PFGE, se seleccionaron 6 aislamientos a los que se les realizaron los ensayos detallados en las páginas siguientes:

2.3.2 Tipo de secuencia de múltiples locus (MLST):

Esta técnica se realizó a 6 aislamientos, los cuales fueron seleccionados por pertenecer a diferentes grupos clonales por PFGE de acuerdo al protocolo descrito por el instituto Pasteur {Diancourt et al., 2005, #91559}. El protocolo completo desarrollado en este trabajo se encuentra como Anexo B.

Interpretación de resultados:

Las secuencias de los alelos fueron verificadas en "<http://pubmlst.org/kpneumoniae>" <http://pubmlst.org/kpneumoniae> un número de alelos diferentes, se le asignó una secuencia distinta dentro de un locus, así mismo se le atribuye un número de tipo de secuencia (ST) a cada combinación de alelos distinta.

2.4 Caracterización del entorno genético del gen *bla_{KPC}*

La determinación de estructuras genómicas que flanquean el gen *bla_{KPC}* fueron realizadas por amplificación con PCR de las secuencias corriente arriba adyacentes al gen *bla_{KPC}* y la identificación de secuencias de inserción.

- **Procedimiento:**

Se amplificó una región de 2880pb que comprende genes de la transposasa A (*tnpA*), las secuencias de inserción SKpn7 y una parte del gen *bla_{KPC}*.

Condiciones de PCR: la PCR fue desarrollada en un termociclador de BioRad utilizando 2µl de DNA, utilizando los reactivos descritos abajo:

Reactivo	Concentración inicial	volumen en µL por reacción
Primer KPC-FR (China 10)	20µM	0,5
Primer R <i>tnpAF</i> (Naas 10)	20µM	0.5
GoTaq® Green Master Mix 2X	5U/µL	10
Agua	-	8
ADN	50ng/µL	1
Total	---	20

Ciclo de amplificación	Temperatura	Tiempo
Inicio	95°C	10 min
Denaturación	95°C	30 seg
Anillamiento	55°C	30 seg
Extensión final	72°C	1min
Extensión	72°C	10min
Conservación	12°C	Indefinido

35 ciclos

Los productos de PCR obtenidos, se evaluaron por electroforesis en un gel de agarosa 1,5%.

Secuenciación:

Una vez obtenido el producto de amplificación por PCR se procedió a realizar la secuenciación en el equipo ABI PRISM® 377, de acuerdo al protocolo estandarizado en el Laboratorio ALERTA. División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Federal de San Pablo (UNIFESP) San Pablo, Brasil. Para la secuenciación se utilizaron los primers descritos a continuación:

PRIMERS	Secuencia
KPC-FR(China 10)	CCT TGA ATG AGC TGC ACA GT
<i>tnpAF</i> (Naas 10)	CAC CTA CAC CAC GAC GAA CC
ISKpn7 F	ACC TGG GCT AGT TTG GCG GC
ISKpn7 R	CCT GAC CAC TCC CGC CTT CCT
ISKpn7int F	GCA CCG TTT TCA CCC CGG CT
ISKpn7int R	AGC TGA AGT CCT CGC GCA CC

Interpretación de resultados:

Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas con el software BLASTn disponible en el sitio web del NCBI National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Se realizó una comparación con los primeros aislamientos colombianos reportados de KPC números de acceso GenBank: EU176012, EU176013 y EU176014.

2.5 Detección de genes de resistencia:

Se realizó la detección de genes que codifican para enzimas tipo TEM, SHV y GES, PER, CTX-M y enzimas tipo OXA. Siguiendo las condiciones descritas a continuación: Todas las PCR fueron desarrolladas en un termociclador de BioRad® utilizando 2µl de DNA, con los primers descritos en la tabla 1-2.

2.5.1 Detección de betalactamasas:

- **Condiciones de PCR para la detección de genes que codifican para enzimas TEM – SHV - GES:**

Se utilizó marcador de peso molecular (MPM) de 100pb y se utilizaron los controles positivos disponibles en Laboratorio ALERTA. División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Federal de San Pablo (UNIFESP) San Pablo, Brasil.

CPOS (218): TEM

CPOS (28): SHV

CPOS (54): GES

REACTIVOS	Cantidad en μL
GoTaq® Green Master Mix 2X	10
Primer TEM F	0.25
Primer TEM R	0.25
Primer SHV F	0.25
Primer SHV R	0.25
Primer GES F	0.25
Primer GES R	0.25
Agua	7.5
ADN	1
TOTAL	20

Ciclo de amplificación	Temperatura	Tiempo
Inicio	94°C	10 min
Denaturación	94°C	25 seg
Anillamiento	53°C	40 seg
Extensión final	72°C	50 seg
Extensión	72°C	10min

30 ciclos

- **Condiciones de PCR para la detección genes que codifican para enzimas tipo PER**

Se utilizó marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb y se utilizaron los controles positivos disponibles en Laboratorio ALERTA. División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Federal de San Pablo (UNIFESP) San Pablo, Brasil.

CPOS (532): PER-2

REACTIVOS	Cantidad en μL
GoTaq® Green Master Mix 2X	5
Primer PER-2 F	0.25
Primer PER-2 R	0.25
Agua	4
ADN	0.5
TOTAL	10

Ciclo de amplificación	Temperatura	Tiempo
Inicio	95°C	10 min
Denaturación	95°C	30 seg
Anillamiento	55°C	30 seg
Extensión final	72°C	2 min
Extensión	72°C	10min

35 ciclos

- **Condiciones de PCR para la detección de genes que codifican para enzimas tipo OXA:**

Se utilizó marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb y se utilizaron los controles positivos disponibles en Laboratorio ALERTA. División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Federal de San Pablo (UNIFESP) San Pablo, Brasil.

CPOS (172): OXA-1

CPOS (54): OXA-2

CPOS (2): OXA-7

CPOS (14): OXA-18

REACTIVOS	Cantidad en μL
GoTaq® Green Master Mix 2X	10
Oxa 1 F	0.25
Oxa 1 R	0.25
Oxa 2 F	0.25
Oxa 2 R	0.25
Oxa 5 F	0.25
Oxa 5 R	0.25
Oxa 7 F	0.75
Oxa 7 R	0.75
Oxa 18 F	0.25
Oxa 18 R	0.25
Oxa 45 F	0.25
Oxa 45 R	0.25
Oxa 46 F	0.25
Oxa 46 R	0.25
Agua	4.5
ADN	1
TOTAL	20

Ciclo de amplificación	Temperatura	Tiempo
Inicio	95°C	10 min
Denaturación	95°C	30 seg
Anillamiento	60°C	30 seg
Extensión final	72°C	1 min
Extensión	72°C	10min

35 ciclos

- **Condiciones de PCR para la detección de genes que codifican para enzimas CTX-M**

Se utilizó marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb y se utilizaron los controles positivos disponibles en Laboratorio ALERTA. División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Federal de San Pablo (UNIFESP) San Pablo, Brasil.

CPOS (154): CTXM 1- 2

CPOS (1): CTXM-8

CPOS (25): CTXM-14

CPOS (35): CTXM-15

REACTIVOS	Cantidad en μL
GoTaq® Green Master Mix 2X	10
Primer 1-2 F	0.25
Primer 1-2 R	0.25
Primer 8 F	0.5
Primer 8 R	0.5
Primer 14 F	0.25
Primer 14 R	0.25
Agua	7
ADN	1
TOTAL	20

Ciclo de amplificación	Temperatura	Tiempo
Inicio	94°C	10 min
Denaturación	94°C	25 seg
Anillamiento	53°C	40 seg
Extensión final	72°C	50 seg
Extensión	72°C	10min

30 ciclos

2.5.2 Detección de genes que codifican para enzimas tipo metilasas:

- Condiciones de PCR para la detección de *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA*, *npmA*:

Se utilizó marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb y se utilizaron los controles positivos disponibles en Laboratorio ALERTA. División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Federal de San Pablo (UNIFESP) San Pablo, Brasil.

REACTIVOS	Cantidad en μL
GoTaq® Green Master Mix 2X	9
Primer <i>rmtA</i> F	0.5
Primer <i>rmtA</i> R	0.5
Primer <i>rmtB</i> F	0.5
Primer <i>rmtB</i> R	0.5
Primer <i>rmtC</i> F	0.5
Primer <i>rmtC</i> R	0.5
Primer <i>rmtD</i> F	0.5
Primer <i>rmtD</i> R	0.5
Primer <i>armA</i> F	0.5
Primer <i>armA</i> R	0.5
Primer <i>npmA</i> F	0.5
Primer <i>npmA</i> R	0.5
Agua	7
ADN	1
TOTAL	23

Ciclo de amplificación	Temperatura	Tiempo
Inicio	94°C	10 min
Denaturación	94°C	20 seg
Anillamiento	52°C	45 seg
Extensión final	72°C	30 seg
Extensión	72°C	10min

35 ciclos

2.5.3 Detección de genes que codifican para enzimas tipo acetilasas:

- **Condiciones de PCR para la detección de *aad*:**

Se utilizó marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb y se utilizaron los controles positivos disponibles en Laboratorio ALERTA. División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Federal de San Pablo (UNIFESP) San Pablo, Brasil.

REACTIVOS	Cantidad en μL
GoTaq® Green Master Mix 2X	5
Primer <i>aad</i> F	0.25
Primer <i>aad</i> R	0.25
Agua	4
ADN	0.5
TOTAL	10

Ciclo de amplificación	Temperatura	Tiempo
Inicio	95°C	10 min
Denaturación	95°C	30 seg
Anillamiento	55°C	30 seg
Extensión final	72°C	2 min
Extensión	72°C	10min

35 ciclos

2.5.4 Detección plásmidos que confieren resistencia a fluoroquinolonas:

Se utilizó marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb y se utilizaron los controles positivos disponibles en Laboratorio ALERTA. División de Enfermedades Infecciosas de la Universidad Federal de San Pablo (UNIFESP) San Pablo, Brasil.

CPOS (30): *qnrA*

CPOS (28): *qnrB1*

CPOS (26): *qnrS*

CPOS (17): *qnr B-S*

- Condiciones de PCR para la detección de *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*.

REACTIVOS	Cantidad en μL
GoTaq® Green Master Mix 2X	10
Primer <i>qnrA</i> F	0.5
Primer <i>qnrA</i> R	0.5
Primer <i>qnrB</i> F	0.5
Primer <i>qnrB</i> R	0.5
Primer <i>qnrS</i> F	0.5
Primer <i>qnrS</i> R	0.5
Agua	6
ADN	1
TOTAL	20

Ciclo de amplificación	Temperatura	Tiempo
Inicio	94°C	10 min
Denaturación	94°C	1 min
Anillamiento	54°C	1 min
Extensión final	72°C	1 min
Extensión	72°C	10min

35 ciclos

2.6 Caracterización de plásmidos que portan genes que confieren resistencia a los antibióticos:

2.6.1 Plásmidos:

Se realizó determinación de plásmidos en los 6 aislamientos seleccionados para caracterización de entorno genético de acuerdo a las técnicas descritas a continuación:

Aislamiento: el ADN plasmídico fue obtenido por el método de Kieser, el registro fotográfico, digitalización y análisis del tamaño de los plásmidos se realizó con el programa Quantity One en el equipo Gel Doc® de Biorad. Para la detección por PCR de los genes de resistencia en el ADN plasmídico separado por electroforesis, en un gel de agarosa 0,8% a 90 voltios por 3 horas de corrido. Posteriormente la porción de agarosa se sometió al proceso de extracción de ADN, con kit. Se utilizó una cepa control de *E. coli* 50192 con plásmidos previamente caracterizados de 154 kb, 66,1 kb, 37,6 kb.

Hibridación por southern blot: el DNA plasmídico fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y se hibridó con una sonda del amplicon del gen *bla_{KPC}* de 880-bp marcada usando un sistema de detección de digoxigenina (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) la cual, una vez es realizada la transferencia a la membrana se revela con anticuerpos antidigoxigenina de acuerdo a lo descrito previamente {Sambrook, 1989}.

Conjugación: se utilizó una cepa de *E.coli* J53 (UNIFESP) resistente a la azida de sodio, pero sensible a todos los antibióticos betalactámicos. Se prepararon placas de agar MacConkey con diferentes concentraciones de azida de sodio (100µg, 150µg y 200µg), en las que sembraron los 6 aislamientos *K.pneumoniae* de estudio y la *E.coli*. Solo se obtuvo crecimiento de la *E. coli*.

La cepa de *E. coli* transconjugante se cultivó en caldo y en Agar MacConkey, de las *K.pneumoniae* se sembraron 2 colonias en caldo Trypticase de Soya durante 3 horas. Se pusieron en contacto 800µL de la *E.coli* con 200µL del cultivo de *K.pneumoniae* en agar MacConkey con azida de sodio, se incubaron en agitación a 37°C por tres horas.

Las conjugantes fueron seleccionadas en placas de agar MacConkey con azida de sodio y posteriormente evaluadas por PCR para determinar la presencia del gen *bla_{KPC}*.

2.7 Integrones:

2.7.1 PCR para la detección de Integrones.

Se realizó evaluación de la presencia de Integrones en los 6 aislamientos seleccionados para caracterización de entorno genético. Primero se realizó amplificación por PCR y se procedió a secuenciar los productos obtenidos con los primers descritos en la Tabla 1-2.

REACTIVOS Integrón clase I	
GoTaq® Green Master Mix 2X	10
Primer F Int-1	0.5
Primer R qac	0.5
Agua	8
ADN	1
TOTAL	20

Ciclo de amplificación	Temperatura	Tiempo
Inicio	95°C	10 min
Denaturación	95°C	30 seg
Anillamiento	52°C	30 seg
Extensión final	72°C	3 min
Extensión	72°C	10min

35 ciclos**Interpretación de resultados:**

Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas con el software BLASTn disponible en el sitio web del NCBI National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>" <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.8 Porinas

Se realizó evaluación de porinas en los 6 aislamientos seleccionados para caracterización de entorno genético de acuerdo a las técnicas descritas a continuación:

Primero se realizó amplificación por PCR de los genes de *OmpK35*, *OmpK36* y *OmpK37*, y se procedió a realizar secuenciación de los productos obtenidos.

2.8.1 PCR para la detección de genes que codifican para las porinas *OmpK35*, *OmpK36* y *OmpK37*.

PCR <i>OmpK35</i>	
REACTIVOS	Cantidad en μL
GoTaq® Green Master Mix 2X	10
Primer <i>OmpK35</i> F	0.5
Primer <i>OmpK35</i> R	0.5
Agua	8
ADN	1
TOTAL	20

PCR <i>OmpK36</i>	
REACTIVOS	Cantidad en μL
GoTaq® Green Master Mix 2X	10
Primer <i>OmpK36</i> F	0.5
Primer <i>OmpK36</i> R	0.5
Agua	8
ADN	1
TOTAL	20

PCR <i>OmpK37</i>	
REACTIVOS	Cantidad en μL
GoTaq® Green Master Mix 2X	10
Primer <i>OmpK 37</i> F	0.5
Primer <i>OmpK 37</i> R	0.5
Agua	8
ADN	1
TOTAL	20

Ciclo de amplificación	Temperatura	Tiempo
Inicio	94°C	10 min
Denaturación	95°C	30 seg
Anillamiento	60°C	30 seg
Extensión final	72°C	3 min
Extensión	72°C	10min

35 ciclos

Interpretación de resultados:

Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas con el software BLASTn disponible en el sitio web del NCBI National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>").

2.8.2 Visualización de porinas por SDS-PAGE

- **Procedimiento SDS-PAGE**

- a. **Extracción:**

- Se tomaron 2 colonias en 15mL de caldo Mueller-Hinton se dejaron e incubación toda la noche a 37°C, se centrifugó a 4.000rpm por 15min se liso el sedimento con 1mL de Buffer Tris-Mg.
- Se realizó sonicación por 5 ciclos de 30 segundos.
- Se centrifugó a 4°C por 5 min a 5.000 rpm, se eliminó el pellet, se centrifugó nuevamente a 4°C por 30 min a 17.000 rpm.
- Se re suspendió el pellet en 800uL de Sarcosil a 2%, se centrifugó a 17.000 rpm por 30min a 4°C. Se lavó el pellet con 1mL de Buffer Tris-Mg.
- Se centrifugó a 17.000 rpm por 30 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendio en 40uL de Tris-Mg Buffer y guardar a -80°C.

- b. **Preparación del gel**

Gel SDS-PAGE			
	Solución stock	volumen	final
1	Agua	12,8 mL	
2	30%-0,8% Acrila-Bisacrilamida	7,33 mL	11%
3	10% SDS (10g en 100mL)	400 µL	0,2%
4	Buffer resolving 1,5M	5mL	0,375M
5	TEMED	40 µL	0,20%
6	10% APS	50 µL	0,0250%

- Se mezclaron todos los componentes de la lista descrita arriba, en el soporte de electroforesis.
- Antes de que se polimerizara se adicionaron 200 mL de agua e isopropanol.
- Después de polimerizado el gel se retiró el agua con papel absorbente, se retiró el gel del soporte y se almacenó en la nevera.

c. Cuantificación de proteínas

Se utilizó la solución de Bradford, para realizar las diluciones de acuerdo al formato descrito abajo para realizar una curva.

Tubo	Albúmina	Fuente	SIn Bradford	[final]
1	40 μ L	Frasco 2mg/mL	3160 μ L	25
2	65 μ L	Frasco 2mg/mL	6435 μ L	20
3	30 μ L	Frasco 2mg/mL	3970 μ L	15
4	3250 μ L	Tubo 2	3250 μ L	10
5	3250 μ L	Tubo 3	3250 μ L	5
6	3250 μ L	Tubo 4	3250 μ L	2,5
7	3000 μ L	Tubo 5	3000 μ L	1,25
8	-	-	3000 μ L	0 (blanco)

Se realizó la lectura en 585nm, iniciando con un blanco empezando desde la menor a la mayor concentración (tubo 7 a tubo1), adicionando 10 μ L de la muestra en 1000 μ L de Bradford, en el momento de la lectura.

Ejemplo: si el resultado de la muestra es 7 μ g en 10 μ L, tenemos 0,7 μ g/ μ L como la concentración de la proteína de la muestra.

Para colocar en el gel se igualaron las concentraciones de las proteínas de las muestras, Se calculó para cada muestra:

$$C1 \times V1 = Cf \times Vf$$

$$Vf = 20 \mu\text{L}$$

Cf = es la menor concentración obtenida dividida por 2

C1 = es la concentración de la muestra.

V1 = volumen que se coloca de la muestra

Electroforesis de proteínas:

- Se cuantificó la concentración de proteínas para ajustar la proporción buffer carga/muestra.
- Se mezcló el buffer de carga con la muestra por 5 minutos.
- Se montó el gel en el soporte de electroforesis.
- Se corrió a 10V por ~30 min (dejando entrar el gel) enseguida se cambió a 20V por ~2horas (hasta que el buffer de carga llegue al final del gel).
- Se retiró el gel de la cámara y se pasó a un gel con buffer de electroforesis.
- Se coloreo el gel con Azul Comassie por 15 min en agitación leve.
- Se decoloro con solución de metanol-ácido acético por 30 minutos a 1 hora
- Se lavo con agua destilada por 2 minutos (2X).
- Se fijó el gel con (GelDry Drying Solution – Invitrogen) ~100mL por 20 minutos.

Interpretación de resultados:

Las secuencias de nucleótidos fueron analizadas con el software BLASTn disponible en el sitio web del NCBI National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> "<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>").

Tabla 1-2. Primers utilizados en la determinación y secuenciación de genes relacionados con resistencia bacteriana.

Nombre de la prueba	PRIMERS	Secuencia o referencia
KPC	Primer KPC F	TCG CTA AAC TCG AAC AGG
	Primer KPC R	TTA CTG CCC GTT GAC GCC CAA TCC
CTXM-2 Single	Primer CTX-M-F1 (pre)	SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA
	Primer CTXpréR	CAC TTT TGC CGT CGT CTA AGG CG
Contexto genético KPC	Tn3tnpR-F(China 4)	GGC AAT ACT GAG CTG ATG AG
	ISKpn6F(China 16)	CGA ACA TAA GGC CGA ACG TG
	ISKpn6R(China 15)	ACA GAT ACG CCA TTC GCC TC
	ISKpn6R(China 14)	TCC GTA GTG AGG CTG TTC TG
	ISKpn8F(China 7)	TGG CCA GGA TGT ACA ACG TC
	ISKpn8R(China 6)	TTA CGT AGA TCC GAG ACA CC
	Tn3tnpR-R(China 5)	GTC TCA ACC AGC CAG CAG TC
	Tn3tnpA-F(China 2)	TTC TGA CCA CTG AGC AGA CT
	Tn3tnpA-R(China 3)	CAG GAC GTT CGT TGC TTA TC
	KPC-FR(China 10)	CCT TGA ATG AGC TGC ACA GT
	KPC-FF(Naas 3)	GGC ACG GCA AAT GAC TA
	ISKpn7FF(Naas 8)	TGA CCC TGA GCG GCG AAG GC
	tnpAF(Naas 10)	CAC CTA CAC CAC GAC GAA CC
	tnpAR(Naas 9)	GCG ACC GGT CAG TTC CTT CT
CTX-M multiplex	Primer 1-2 F	ATG TGC AGY ACC AGT AA
	Primer 1-2 R	CGC TGC CGG TTT TAT CSC CC
	Primer 8 F	AAC RCR CAG ACG CTC TAC
	Primer 8 R	TCG AGC CGG AAS GTG TYA T
	Primer 14 F	GGT GAC AAA GAG ART GCA ACG GAT
	Primer 14 R	TTA CAG CCC TTC GGC GAT GA
BLEE	Primer TEM F	CCC TTA TTC CCT TTY TTG CGG
	Primer TEM R	AAC CAG CCA GCC WGA AGG
	Primer SHV F	CTT GAC CGC TGG GAA ACG G
	Primer SHV R	AGC ACG GAG CGG ATC AAC GG
	Primer GES F	AGC AGC TCA GAT CGG TGT TG
	Primer GES R	CCG TGC TCA GGA TGA GTT G
	Primer PRE SHV F (75)	GAT CGT CAG TCT GCT GGT G
	Primer PRE SHV R (76)	CTA CGA GCC GGA TAA CGC
	Primer SHV F (65)	ATG CGT TWT DTT CGC CTG TGT ATT ATC
	Primer SHV R (66)	TTA GCG TTG CCA GTG RTC GAT C
qnr A B S C D	Primer qnr A F	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG
	Primer qnr A R	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC
	Primer qnr B F	GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG
	Primer qnr B R	TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA
	Primer qnr S F	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT
	Primer qnr S R	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG
	Primer qnr C F	GGG TTG TAC ATT TAT TGA ATC
	Primer qnr C R	TCC ACT TTA CGA GGT TCT
	Primer qnr D F	CGA GAT CAA TTT ACG GGG AAT A
	Primer qnr D R	AAC AAG CTG AAG CGC CTG
Metilinasas	Primer rmtA F	TTG CTT CCA TGC CCT TGC C
	Primer rmtA R	CTA GCG TCC ATC CTT TCC TC
	Primer rmtB F	ATG CAA TGC CGC GCT CGT AT
	Primer rmtB R	GCT TTC TGC GGG CGA TGT AA
	Primer rmtC F	ATC CCA ACA TCT CTC CCA CT
	Primer rmtC R	CGA AGA AGT AAC AGC CAA AG
	Primer rmtD F	CGG AAA CGA TGC GAC GAT
	Primer rmtD R	CGG CAC GCG ATT GGG AAG C
	Primer armA F	ACC TAT ACT TTA TCG TCG TC
	Primer armA R	ATT CTG CCT ATC CTA ATT GG
	Primer npmA F	GCC CAA AGA GAA TTA AAC TG
	Primer npmA R	GGA GGG CTA TCT AAT GTG GT

Continuación Tabla 1-2 Primers utilizados en la determinación y secuenciación de genes relacionados con resistencia bacteriana.

Nombre de la prueba	PRIMERS	Secuencia o referencia
Porinas	Primer OMPK 35 F(16)	CAG ACA CCA AAC TCT CAT CAA TGG
	Primer OMPK 35 R(17)	AGA ATT GGT AAA CGA TAC CCA CG
	Primer OMPK 35 F(16)	GGA TGG AAA GAT GCC TTC AG
	Primer OMPK 35 R(18)	CGA GGT TCC ATT GTG ATT ACT G
	Primer OMPK 36 F	GCT GTT GTC GTC CAG CAG GTT G
	Primer OMPK 36 R	CAG CAC AAT GAA TAT AGC CGA C
	Primer OMPK 37 F	CAT TCC GCA GAA TGA GAC GGC AAC
	Primer OMPK 37 R	CGA CGA TGT TAT CGG TAG AGA TAC
Oxa	Oxa 1 F	TAT CTA CAG CAG CGC CAG TG
	Oxa 1 R	TGC ACC AGT TTT CCC ATA CA
	Oxa 2 F	CGA TAG TTG TGG CAG ACG AA
	Oxa 2 R	TCT TTG CAC GCA GTA TCC AG
	Oxa 5 F	TGG CAC AGA ATC AAG TCC TG
	Oxa 5 R	TTG CCA TGA TTT TCG TTG AA
	Oxa 7 F	TTT TCA AAT GGG ACG GAA AG
	Oxa 7 R	CCA CTT GAT TAA CTG CGG AAA
	Oxa 18 F	ATG CAA CGG AGC CTG TCC
	Oxa 18 R	GGC AGG GTG TTG AGG AAC T
	Oxa 45 F	GCA GAT GCT CGA ATG CAC
	Oxa 45 R	GGC AAT GCC TTG AGG AAG
	Oxa 46 F	GAT CAG CGA TGC GAA ATT CT
Oxa 46 R	ACC AGC CAA ACC TGC CTT C	
BLEE	Primer PER-1 F (380)	TAT AAA AGC TGT AGT TAC TGC CTC GAC
	Primer PER-1 R (381)	TTA ATT TGG GCT TAG GGC AGA
	Primer PER-2 F (382)	ATG AAT GTC ATC RCA AAA KGT GTT T
	Primer PER-2 R (383)	TYA ATC CGG ACT YAC TGC
	Primer BES F (199)	GGC GCA ATA CAA CGA AGG
	Primer BES R (200)	ATC TTG CAG TAC CAG TCG
Acetilinasas	Primer aad F (87)	CGA CTC AAC TAT CAG AGG TAG
	Primer aad R (88)	GAC TAC CTT GGT GAT CTC GCC
Integron clase I	Primer intl1 F	CCG TAG AAG AAC AGC
	Primer qac R	CGG ATG TTG CGA TTA CTT CG

3. Capítulo Resultados

3.1 Características generales de los aislamientos

Durante el periodo de estudio los 82 aislamientos fueron recuperados y previamente caracterizados como resistentes a cualquier antibiótico tipo carbapenémico, en los hospitales que los remitieron a GREBO, a partir de diferentes muestras: 32,9 % de orina, 25,6% de sangre y el restante 41,5% de cultivos de punta de catéter, aspirado traqueal, herida quirúrgica, hueso, lavado bronquial, líquidos corporales estériles y secreciones peritoneales.

3.2 Determinación de perfiles de sensibilidad antimicrobiana:

3.2.1 Pruebas fenotípicas confirmatorias para BLEE y KPC:

El 28% (23/82) de los aislamientos, fueron detectados por los sistemas automatizados como BLEE positiva, sin embargo al realizar la prueba confirmatoria manual, se encontraron 18 aislamientos adicionales 41/82 (50%).

Para las pruebas de detección fenotípica para carbapenemasa del grupo A, todos los aislamientos fueron positivos al test de Hodge y la sinergia con ácido borónico.

3.2.2 Resultados de sensibilidad antimicrobiana:

Todos los aislamientos presentaron resistencia a ampicilina sulbactam, aztreonam, cefepime, ceftriaxona, ciprofloxacina y gentamicina cuando se evaluaron con sistemas automatizados y Kirby-Bauer.

Todos los aislamientos presentaron sensibilidad a tigeciclina.

Los antibióticos colistina y polimixina se evaluaron en un representante de cada grupo clonal obteniendo una CIM de $<2\mu\text{g/mL}$ para cada antibiótico clasificándolos como sensibles.

- **Antibióticos aminoglucósidos:**

En cerca de la mitad de los resultados generados para amikacina se presentaron diferencias entre la determinación por sistemas automatizados y Kirby-Bauer mostrando un porcentaje de resistencia de 51,2% (40/82) y de 83% (68/82) respectivamente para cada prueba. Se presentaron niveles de resistencia altos en gentamicina CIM $\geq 8\mu\text{g/mL}$ y $\geq 16\mu\text{g/mL}$, al compararlos con la técnica de difusión no se presentaron resultados discordantes.

- **Antibióticos betalactámicos:**

- **Cefalosporinas**

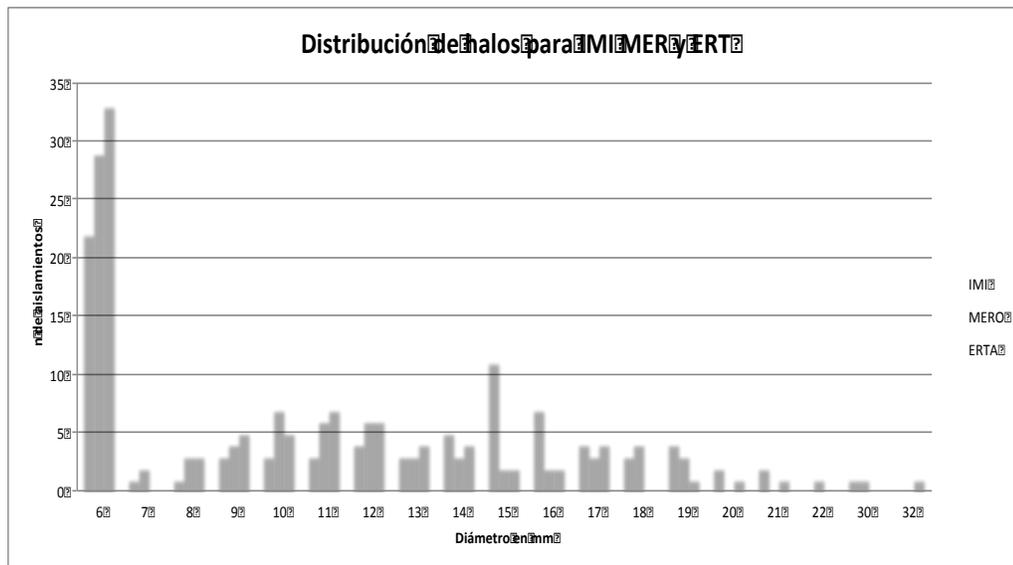
Las CIM para las cefalosporinas de tercera generación CAZ y CTX se encontraron siempre en el rango establecido como resistente por el CLSI con las técnicas de microdilución y de Kirby Bauer. (Tabla 1-3).

- **Carbapenémicos:**

Se realizó el análisis de los resultados generados en los hospitales con los equipos automatizados, utilizando los puntos de corte vigentes al momento de la recuperación de los aislamientos (CLSI 2010), mostrando una resistencia general frente a carbapenémicos de 87,8% dejando el restante 12,2 % clasificado en la categoría de sensible.

Debido a que en los años de remisión de los aislamientos los paneles disponibles en el país y que eran utilizados por los hospitales no incluían ertapenem, nosotros evaluamos este carbapenémico en todos los aislamientos, obteniendo 93,9% (77/82) de aislamientos resistentes (Figura 1-3).

Figura 1-3. Distribución de los halos obtenidos para IMI MER y ERT en los 82 aislamientos de *K.pneumoniae* estudiados.



Con el fin de conocer el valor real de la CIM de los aislamientos frente a carbapenémicos, se evaluaron imipenem y meropenem por E-Test, mostrando resistencia frente a los dos carbapenémicos en todos los aislamientos. Interesantemente la evaluación frente a imipenem reveló una MIC90 >256µg/mL y para meropenem de 64µg/mL (Tabla 1-3).

Tabla 1-3. Perfil de susceptibilidad a los antibióticos evaluados en aislamientos de *K. pneumoniae* KPC-3 de Bogotá.

Antibiótico	Rango CLSI 2012	% S	% I	% R	MIC50	MIC90	Valor Min	Valor Max
AK	<16 - >64	51.2	23.2	25.6	16	32	<8	>64
ATM	<8 - >16	0.0	0.0	100.0	>16	>16	16	>64
FEP	<8 - >32	0.0	0.0	100.0	>16	>16	2	32
CTX	<1 - >4	0.0	0.0	100.0	>32	>32	8	>32
CAZ	<4 - >16	1.2	1.2	97.6	>16	>16	4	>64
CRO	<1 - >4	0.0	0.0	100.0	>32	>32	16	>32
CIP	<1 - >4	0.0	0.0	100.0	>2	>2	>2	>4
GM	<4 - >16	2.4	1.2	96.3	>8	>8	<1	>16
SXT	<2/38 - >4/76	2.4	0.0	97.6	>2/38	>2/38	<2	>2/38
IMI (Panel)	<1 - >4	2.4	0.0	87.8	16	16	0.5	16
IMI (E-test)	<1 - >4	0.0	0.0	100.0	32	>256	2	512
MER (Panel)	<1 - >4	2.4	1.2	90.2	16	16	0.5	16
MER (E-test)	<1 - >4	2.4	1.2	90.2	64	64	1	64
TIG*	<2 - >8	100.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.5	0.5

% S= Porcentaje de resultados sensibles, % I= Porcentaje de resultados intermedio, % R= Porcentaje de resultados resistente

* El rango para Tigeciclina corresponde al establecido por FDA (*Food and Drug Administration*) Wyeth Pharmaceuticals Inc. Tygacil Product Insert. Philadelphia, PA, USA, 2007. <http://www.tygacil.com>

3.3 Determinación de la relación clonal por técnicas estandarizadas

3.3.1 PFGE:

En el ensayo de subtipificación por PFGE, se encontraron 3 clones diferentes en los 82 aislamientos denominados por las primeras letras del alfabeto A, B y C (Figura 2-3); el clon A fue el que más aislamientos agrupó, 39 en total, dentro del cual se encontraron 18 subtipos diferentes, con más del 75% de similitud. El grupo clonal B contenía 25 aislamientos con 14 subtipos y el grupo C con 13 aislamientos y 9 subtipos. Teniendo en cuenta los resultados de diseminación clonal, se seleccionaron 6 aislamientos los cuales pertenecían a un grupo clonal: A (n=2), B (n=1) o C (n=2) y un aislamiento que no presentó agrupamiento, para realizar la caracterización genética posterior, además se determinó la CIM frente a 19 antibióticos por la técnica TREK descrita en la metodología (Tabla 2-3).

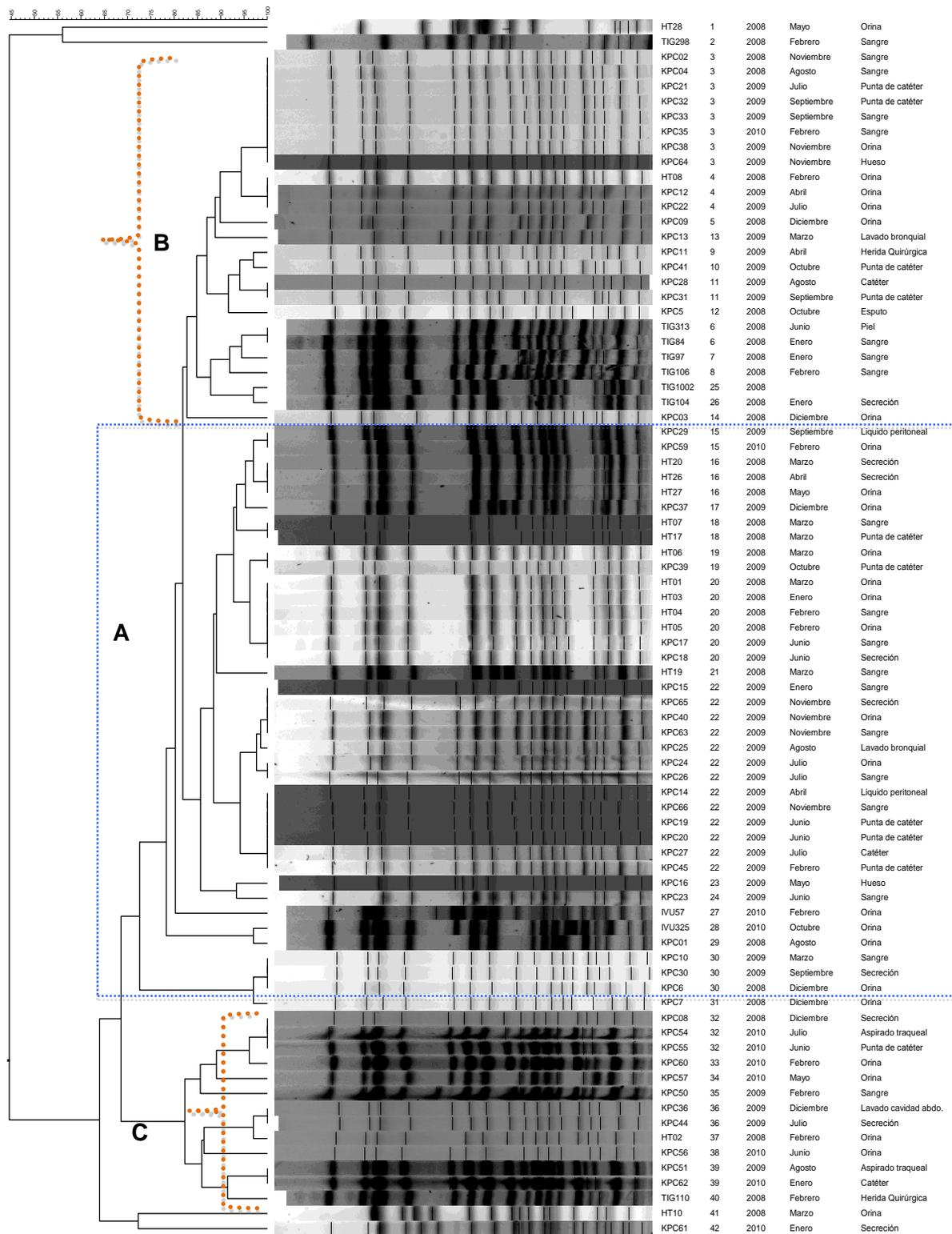
Tabla 2-3. Datos de sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos seleccionados para caracterización genética.

Aislamiento	Fecha	Muestra	AK	A/S	AZT	FEP	CTX	FOX	CAZ	CTN	CIP	GEN	P/T	SXT	DOR	ERT	IMI*	MER*	POL	COL	TIG	Grupo Clonal
K-8	dic-08	Secresión de toracostomía	32	≥32	≥32	8	16	32	≥32	≥8	≥4	1	≥128	≥8	4	≥4	>32	32	2	2	≤0,5	C
K-35	feb-10	Sangre	32	≥32	≥32	≥32	≥64	≥32	≥32	≥8	≥4	≥16	≥128	≥8	≥8	≥4	>256	≥32	2	2	1	B
K-45	jul-09	Punta de catéter	16	≥32	≥32	16	≥64	≥32	≥32	≥8	≥4	≥16	≥128	≥8	≥8	≥4	32	≥32	2	2	1	A
K-55	jun-10	Punta de catéter	≥64	≥32	≥32	≥32	≥64	≥32	≥32	≥8	≥4	≥16	≥128	≥8	≥8	≥4	128	≥32	2	1	≤0,5	C
H-4	feb-08	Sangre	16	32	≥32	32	64	≥32	≥32	≥8	≥4	≥16	≥128	8	≥8	≥4	≥8	4	2	1	≤0,5	A
H-10	mar-08	Orina	32	≥32	≥32	≥32	≥64	≥32	≥32	≥8	≥4	≥16	≥128	≥8	≥8	≥4	128	≥32	2	1	≤0,5	U¶

* Obtenidos por E-Test

¶ Patrón Único

Figura 2-3. Dendrograma 82 aislamientos de *K. pneumoniae* 2005 a 2008.



3.3.2 MLST:

Una vez estandarizada la técnica de PCR según lo descrito en la metodología, se procedió a realizar la secuenciación de los productos obteniendo como resultado el perfil alélico ST-258 para todas las muestras (Tabla 3-3).

Tabla 3-3. Alelos obtenidos por MLST para los 6 aislamientos seleccionados.

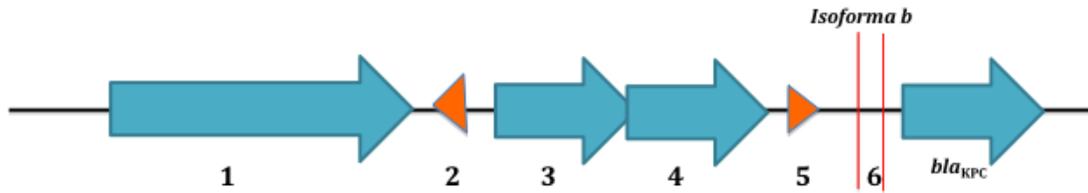
Alelo	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB	ST
Aislamiento								
HT 04	3	3	1	1	1	1	79	258
HT 10	3	3	1	1	1	1	79	258
KPC 08	3	3	1	1	1	1	79	258
KPC 10	3	3	1	1	1	1	79	258
KPC 35	3	3	1	1	1	1	79	258
KPC 45	3	3	1	1	1	1	79	258
KPC 55	3	3	1	1	1	1	79	258

3.4 Caracterización del entorno genético del gen *bla*_{KPC}:

Se determinaron las regiones corriente arriba adyacentes al gen *bla*_{KPC}, secuenciando una región de 2865pb en los 6 aislamientos seleccionados encontrando los siguientes elementos genéticos (Figura 3-3):

1. **TnpA**: que codifica para una transposasa.
2. **ISKpn7**: con una longitud de 1956pb que codifica para dos ORF (Open Reading Frame) consecutivos designados *istA* un marco grande corriente arriba e *istB*, un marco más pequeño corriente abajo.
3. **istA**: codifica una transposasa putativa de 341 aminoácidos.
4. **istB**: codifica para una proteína que ayuda a la transposición de 259 aminoácidos.
5. **(IR)**: Repetición invertida de *ISKpn7*.
6. Nuestros aislamientos correspondieron a la isoforma b del Tn4401 es decir no presenta deleciones corriente arriba del gen *bla*_{KPC} características de la isoformas a y c.

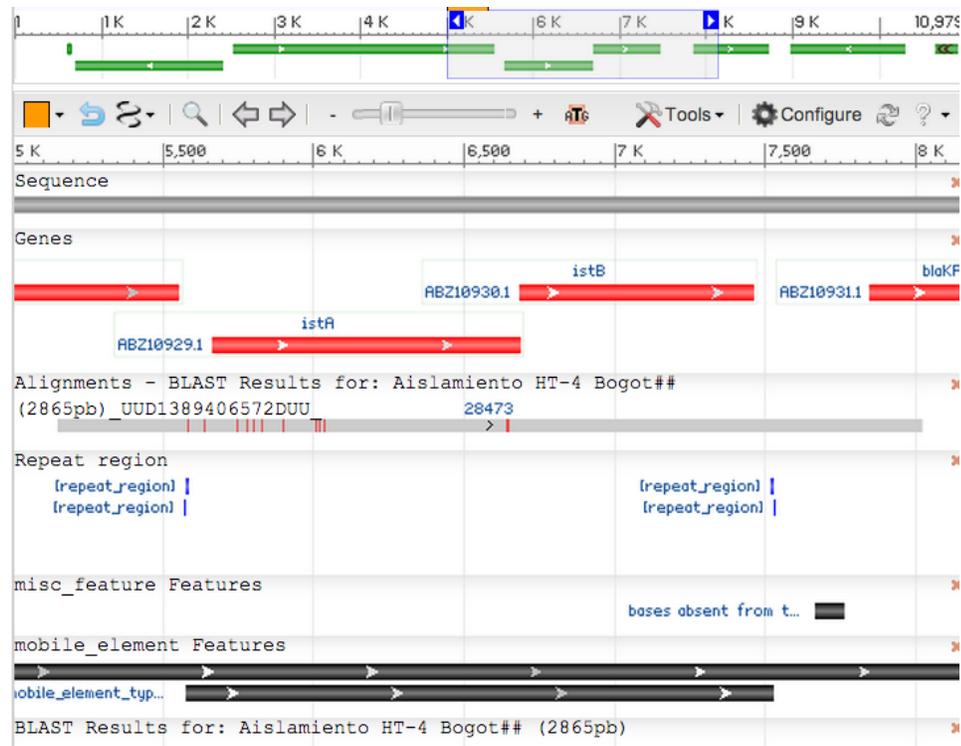
Figura 3-3. Representación esquemática identificando las estructuras genéticas en aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* KPC-3 recuperadas en Bogotá.



Los genes y la orientación de transcripción están indicadas por las flechas horizontales, los triángulos representan las IRs de ISKpn7, las líneas verticales indican la región de 100pb que lo caracterizan como isoforma b.

Al comparar nuestros resultados con los primeros aislamientos colombianos con KPC, previamente caracterizados por Naas y colaboradores en 2008, reportados con números de acceso GenBank: EU176012, EU176013 y EU176014 no se encontraron diferencias entre los contextos genéticos evaluados (Figura 4-3).

Figura 4-3. Imagen de la región secuenciada en el aislamientos HT-4 de *Klebsiella pneumoniae* KPC-3 comparada con el aislamiento EU176014.



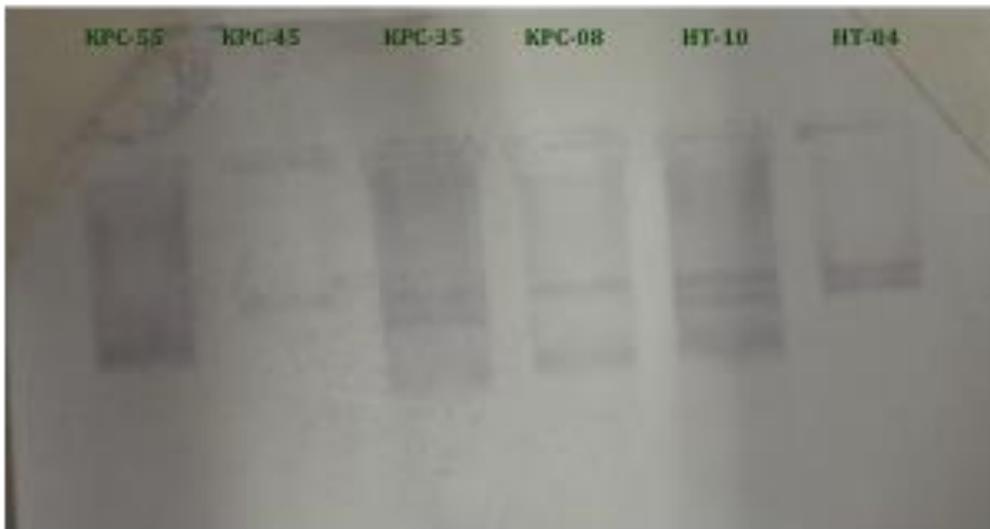
Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/167077404?report=graph&from=5150&to=8014>

3.6 Detección de elementos genéticos que confieren resistencia a varias clases de antibióticos

3.6.1 Análisis de plásmidos

Para determinar si el gen *bla*_{KPC} se encontraba en plásmidos se realizó la técnica de Southern Blot, una vez se obtuvo la transferencia del ADN plasmídico a la membrana de nitrocelulosa y se realizó el ensayo de hibridación con una sonda complementaria al gen. La hibridación fue positiva, confirmando la presencia del gen en el material plasmídico obtenido de nuestros aislamientos. (Imagen 1-3)

Imagen 1-3. Membrana de hibridación por Southern Blot con una sonda de KPC, sobre los plásmidos extraídos de los aislamientos.

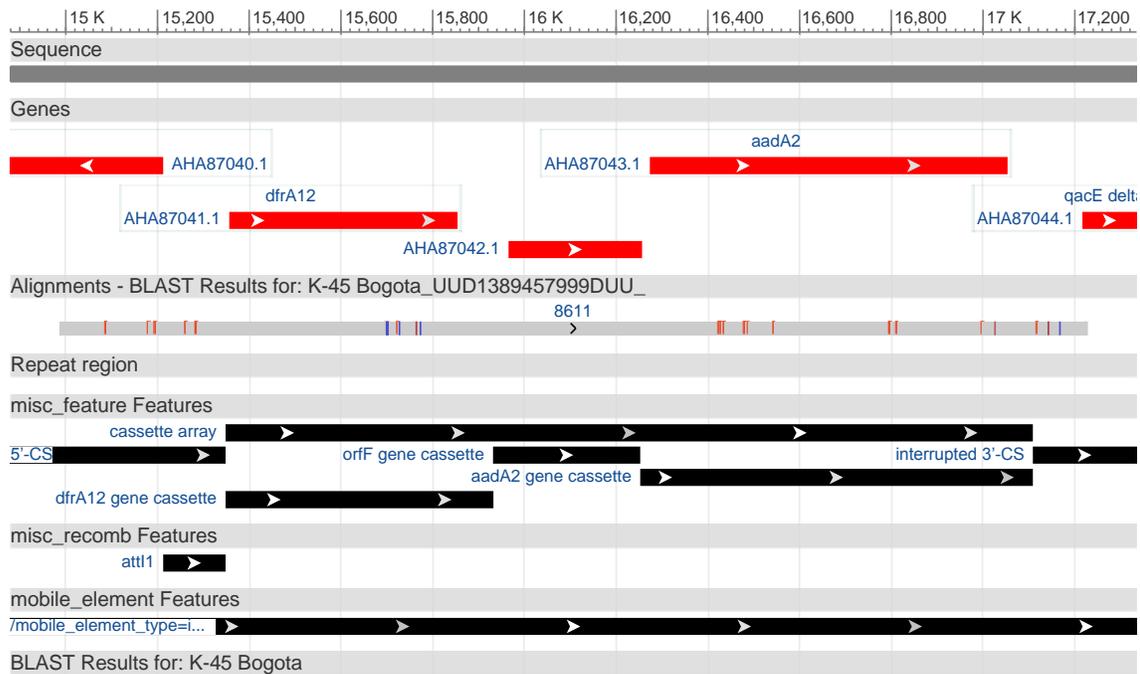


Para determinar si estos plásmidos tenían la capacidad de transferirse, se realizaron ensayos de conjugación con los 6 aislamientos de *K.pneumoniae*, obteniendo cepas de *E.coli* transconjugantes (*E. coli*J53+KPC-3). Las cuales se identificaron como KPC positivas determinando la presencia del gen *bla*_{KPC} por PCR.

3.6.2 Análisis de Integrón Clase I

Se secuenciaron 2242pb en los seis aislamientos seleccionados, en donde se encontró un integrón de clase 1 con un sitio primario de recombinación *attI* seguido por dos genes en un cassette, el *dfrA12*, que confiere resistencia a trimetoprim y el *aadA2* que codifica una enzima modificadora de aminoglucósidos y confiere resistencia a espectinomicina y estreptomycin; este tipo de genes pueden permanecer en un integrón aun cuando no exista presión selectiva o cese el uso de estos antimicrobianos, adicionalmente se encontró el gen *qacE-1* truncado el cual confiere resistencia a los compuestos de amonio cuaternario este generalmente es seguido del gen *sul*, que confiere resistencia a las sulfonamidas aunque con los iniciadores utilizados en este estudio no fue posible determinarlo, se presume su presencia (Figura 5-3) ver anexo E.

Figura 5-3. Esquema de integrón clase I encontrado en los seis aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* KPC-3 evaluados.

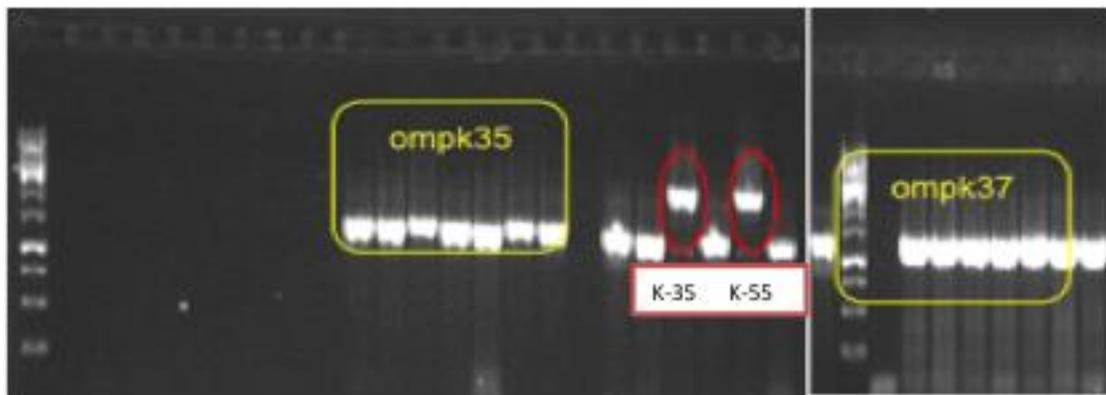


Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/558708259?report=graph&from=14991&to=17223>

3.6.3 Análisis de porinas

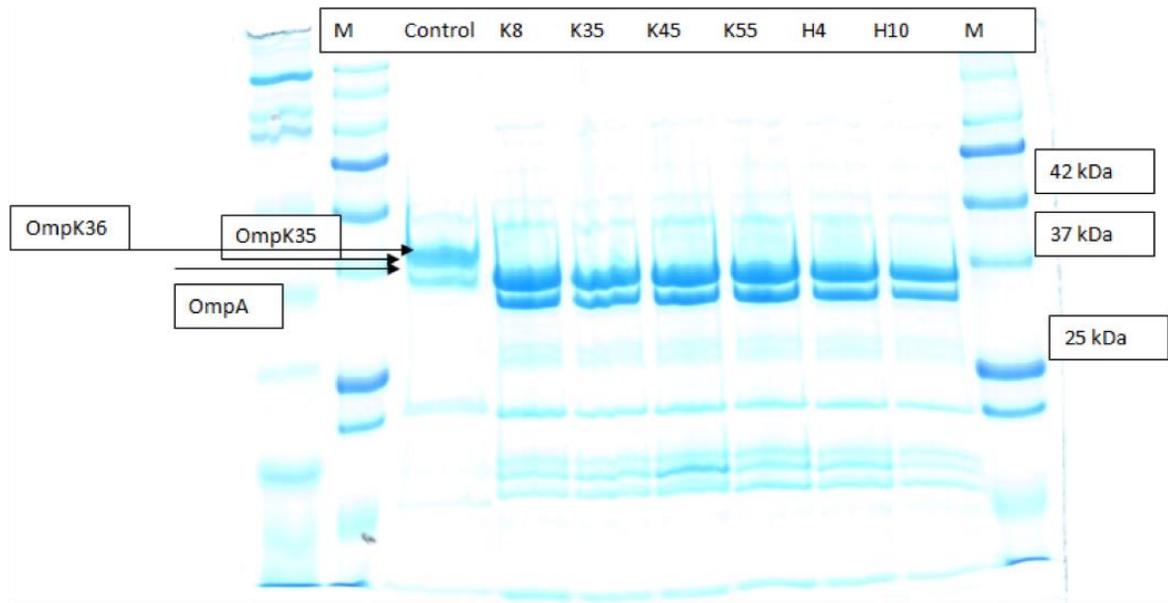
Por PCR se determinó la presencia de los genes que codifican para las tres porinas evaluadas *OmpK35*, *OmpK36* y *OmpK37*, sin embargo como se muestra en la imagen 2-3 los aislamientos K35 y K55 presentaron un fragmento de mayor tamaño al esperado.

Imagen 2-3. PCR para *OmpK-35*, *OmpK-36* y *OmpK-37* de los 6 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* KPC-3 evaluados.



Para realizar la visualización y separación de las porinas, de los seis aislamientos se realizó la técnica SDS-PAGE, donde no se logró evidenciar la presencia de *OmpK35* y *OmpK36*. Debido a que *OmpK 37* tiene un peso molecular parecido al de *OmpA*, la técnica no permite distinguir su presencia en el gel (Imagen 3-3).

Imagen 3-3. Gel de SDS-PAGE para *OmpK-35*, *OmpK-36* y *OmpK-37* de los 6 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* KPC-3 evaluados



Para mejorar la comprensión de los resultados obtenidos para la presencia de porinas, se llevó a cabo un análisis de secuenciación encontrando lo siguiente (Tabla 5-3):

- Para *OmpK35* se secuenció un producto de 1081pb, evidenciando la inserción de un nucleótido (G) en la posición 121 generando un codón de parada prematuro en el aminoácido 89 inhibiendo su expresión (anexo F).
- Para *OmpK36* se secuenció un producto de 1104. Se encontraron diferencias entre los 6 aislamientos; en H4 y H10 se encontró una inserción de 6 nucleótidos (GACACC) en la posición 409 (anexo G). Y en K8 y K45 se presentaron mutaciones puntuales (ver anexo H). Para K-35 y K-55 se presentó una inserción que no pudo ser secuenciada.
- Para el gen que codifica *OmpK37* no se presentaron mutaciones (anexo I).

Tabla 5-3. Resultados de la detección de porinas encontrado en los 6 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* KPC-3 evaluados

Aislamiento	Diferencias encontradas en la secuencia de nucleótidos de los genes de las porina			Visualización en gel de SDS-PAGE			
	<i>ompK35</i>	<i>ompK36</i>	<i>ompK37</i>	OmpA	OmpK35	OmpK36	OmpK37*
K-8	G ₍₋₁₂₁₎ ; Stop codon (aa 89)	P ₁₇₈ V, R ₃₄₉ H	0	(+)	(-)	(-)	(-)
K-35	G ₍₋₁₂₁₎ ; Stop codon (aa 89)	IS5	0	(+)	(-)	(-)	(-)
K-45	G ₍₋₁₂₁₎ ; Stop codon (aa 89)	F ₁₇₈ V, H ₃₅₅ H, G ₃₆₂ D	0	(+)	(-)	(-)	(-)
K-55	G ₍₋₁₂₁₎ ; Stop codon (aa 89)	IS5	0	(+)	(-)	(-)	(-)
H-4	G ₍₋₁₂₁₎ ; Stop codon (aa 89)	GACACC ₍₋₄₀₉₎	0	(+)	(-)	(-)	(-)
H-10	G ₍₋₁₂₁₎ ; Stop codon (aa 89)	GACACC ₍₋₄₀₉₎	0	(+)	(-)	(-)	(-)

* Debido a que *OmpK 37* tiene un peso molecular parecido al de *OmpA*, la técnica no permitió distinguir su presencia en el gel.

4. Capítulo Discusión y conclusiones

Los carbapenémicos son considerados antibióticos efectivos para el tratamiento de infecciones asociadas al cuidado de la salud. Su estabilidad frente a la mayoría de betalactamasas incluidas las BLEE, es una de las características que les permite tener un espectro de actividad amplio {Papp-Wallace et al., 2011}. Aunque precisamente esta característica, condujo al incremento en la utilización de estos antibióticos, cuando entre los años 1980 y 1990 en el mundo se presentó un aumento en la prevalencia de BLEE en aislamientos de *K. pneumoniae* y *E. coli* {Endimiani and Paterson, 2007}. Consecuencia de ese uso indiscriminado, fue precisamente la emergencia de las cepas productoras de carbapenemasas.

La evolución de las bacterias portadores de carbapenemasas, tales como la capacidad de transferirse intra e interespecies, la adquisición genes de resistencia a varios antibióticos y la capacidad de diseminarse en forma de clones que se mantienen en el tiempo {Salmond, 2008}, son características claves para que esta problemática haya alcanzado tales dimensiones.

Los sistemas de salud continúan contribuyendo al mantenimiento de esta problemática en la actualidad. Factores como la inadecuada determinación de la CIM, conduce a una selección de cepas resistentes al ser expuestas a dosis no letales de carbapenémicos. El no diagnosticar la presencia de estas enzimas, impide adoptar las precauciones en control de infecciones requeridas para evitar la diseminación de este tipo de microorganismos a nivel institucional. Generando así un ambiente propicio para que, como lo vimos en este trabajo, se produzca una diseminación a nivel local, y como se ha demostrado ya pueda constituirse en un problema nacional.

El abordaje de esta situación debe realizarse desde todas las perspectivas, es decir, conociendo las características fenotípicas y genotípicas propias de los microorganismos que se encuentran en cada nivel: local, regional, nacional y mundial. Tener presente las limitaciones de diagnóstico y tratamiento, pero también las alternativas disponibles para contrarrestar dichas limitaciones. Y por último hacer uso de las estrategias de mitigación y control frente a estos microorganismos. Lo anterior permitirá disminuir en cierta medida las consecuencias generadas por la adquisición de una infección con este tipo de bacterias.

Este trabajo describe las características propias de los aislamientos de *K. pneumoniae* que causaron infecciones a nivel hospitalario, en diferentes instituciones de la ciudad más grande de Colombia. Las cuales tenían como característica común la diseminación de un patógeno con características clonales y altamente resistente a los antibióticos, el cual permaneció en algunos hospitales hasta por varios años.

Las técnicas disponibles para evaluar perfiles de sensibilidad frente a carbapenémicos son variadas, las más utilizadas en nuestros hospitales, son los equipos automatizados. Estos difieren en las diluciones de antibióticos a evaluar, de acuerdo al fabricante. Aunque son una buena herramienta para la rápida identificación y determinación de CIM, su utilización ha demostrado un comportamiento variable frente a la detección de resistencia de bajo nivel en microorganismos productores de carbapenemasas {Pasteran et al., 2011}.

En nuestro estudio se realizaron técnicas fenotípicas manuales para la identificación de carbapenemasas, con el fin de contrastar los resultados de la CIM obtenida por los equipos automatizados. La sinergia con AFB y el TMH permitieron clasificar adecuadamente todos nuestros aislamientos como portadores de carbapenemasas, incluso en los casos en que la CIM reportaba sensibilidad frente a carbapenémicos. Lo anterior, se compara con lo reportado por otros laboratorios en el mundo, donde describen la utilidad de estas pruebas, como complemento a los resultados generados por los equipos automatizados y semiautomatizados {Tsakris et al., 2009}, {Doi et al., 2008} {Giske et al., 2011}.

Lo anterior muestra que los perfiles de sensibilidad antimicrobiana obtenidos por sistemas automatizados, pueden ser eficientemente complementados con el uso de pruebas de detección fenotípica de enzimas. Una opción puede realizar el montaje del panel o tarjeta de manera alterna con estas pruebas, incluso con la misma suspensión bacteriana, optimizando así, el tiempo en el reporte de este tipo de mecanismos de resistencia. Antes de 2012, en nuestro país las pruebas de detección fenotípica de enzimas no se encontraban normalizadas y cada institución las utilizaba o no, de acuerdo a sus propios criterios. En la actualidad, el Grupo de Microbiología del INS, como laboratorio de referencia nacional, tiene disponible un manual que detalla la información necesaria para el montaje e interpretación de estas pruebas {Redes en Salud Pública Grupo de Microbiología, 2012}.

Otra de las consideraciones que se deben tener en cuenta en los laboratorios de microbiología son los puntos de corte para la interpretación de los resultados. En nuestro país la mayoría de los laboratorios aplican las normas americanas generadas por el CLSI, las cuales presentan actualizaciones cada año y que para 2010 conceptuaron disminuir puntos de corte de todos los carbapenémicos con el fin de captar la mayoría de aislamientos productores de carbapenemasas sin necesidad de realizar pruebas de detección fenotípica de enzimas con THM. A este respecto varios autores han desarrollado trabajos con aislamientos propios de la epidemiología de su país, detectando que aunque se disminuyan los puntos de corte no se lograrán captar todas las cepas productores de carbapenemasas, produciendo un impacto negativo en el desenlace de las infecciones. {Vading et al., 2011} {Polsfuss et al., 2011} {Endimiani et al., 2010}.

Ante esta situación, en Colombia en el año 2012 se generó un consenso de expertos a nivel nacional convocado por el Grupo de Infecciones Asociadas al Cuidado de la Salud (IAACS) del INS donde se sugirió la utilización de puntos de corte frente a carbapenémicos recomendados por el CLSI en su actualización del año 2012, pero contrario a lo que sugiere CLSI no se recomendó dejar de utilizar las pruebas de detección fenotípica de enzimas, debido a que son fundamentales para programa de epidemiología y control de infecciones.

El análisis de los resultados de CIM de nuestros aislamientos, con los puntos de corte modificados, los clasificaron todos como resistentes, contrario a lo que ocurrió en el momento de su aislamiento es decir en los años 2008 a 2010, donde un porcentaje de estos fue reportado con resistencia intermedia o incluso sensible frente a algún carbapenémico a pesar de portar la enzima.

Aunque el problema de resistencia enzimática a los carbapenémicos es de carácter mundial, también se ha demostrado que cada país tiene comportamientos específicos, que pueden y deben ser encaminados a obtener puntos de corte epidemiológicos y la estandarización en el reporte de resultados. En esta materia, varios autores han comparado la capacidad de los paneles y tarjetas de los equipos automatizados disponibles en su país para detectar adecuadamente la resistencia en las cepas bacterianas circulantes en sus instituciones. Esto permite validar las diferentes metodologías para la detección mecanismos de resistencia emergentes, así como también la capacidad de los laboratorios para su detección {Woodford et al., 2010} {Davies et al., 2011} {Thomson et al., 2011} {Menozi et al., 2006} {Fisher et al., 2009} {Bulik et al., 2010} {Vading et al., 2011}.

Por lo anterior y de acuerdo a la falta de este tipo de información en nuestro país, consideramos que los resultados obtenidos en nuestro trabajo pueden utilizarse como un acercamiento hacia la validación de equipos automatizados utilizados en los laboratorios de nuestros hospitales, con aislamientos colombianos productores de enzimas tipo carbapenemasas las cuales se encuentran disponibles en los laboratorios de investigación y en el laboratorio de referencia nacional.

Los aislamientos evaluados presentaron un perfil de multirresistencia y adicionalmente CIM elevadas frente a carbapenémicos, (imipenem ($\geq 256\mu\text{g/mL}$) y meropenem ($\geq 32\mu\text{g/mL}$), los primeros aislamientos de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos reportados en Colombia en fueron recuperados en el año 2005 y también presentaban CIM de $\geq 256\mu\text{g/mL}$ para imipenem y meropenem, pero a diferencia de los nuestros, estos eran sensibles a aminoglucósidos y fluoroquinolonas {Villegas et al., 2006}. Lo anterior permite sugerir, que este tipo de microorganismos reportados por primera vez hace 9 años en nuestro país, adquirió mecanismos de resistencia adicionales, además se

estableció y se diseminó geográficamente, entre regiones con características similares en lo que respecta a servicios hospitalarios.

Ertapenem fue el carbapenémico que presentó mayor nivel de resistencia, evidenciada fenotípicamente, lo cual fue evaluado previamente por Bratu y Andreson {Bratu et al., 2005} {Anderson et al., 2007}. Ambos trabajos recomiendan la utilización de este antibiótico como predictor de resistencia frente a carbapenémicos en aislamientos clínicos, incluso, si los paneles o tarjetas de los equipos automatizados no cuentan con esta molécula, como sucedió en nuestro caso, se debe realizar la prueba de difusión por discos. Sin embargo Woodford y colaboradores en 2007 resaltan que la no sensibilidad a ertapenem no es específica para la producción de carbapenemasas, especialmente en lugares donde estas no son comunes y que tampoco predice la resistencia frente a otros carbapenémicos {Woodford et al., 2007}. No obstante, de acuerdo a las características de nuestros aislamientos ertapenem debería considerarse como el primer antibiótico a evaluar cuando se esté sospechando una resistencia frente a carbapenémicos.

El encontrar CIM elevadas en los aislamientos de Bogotá permite una detección acertada en los laboratorios clínicos. Sin embargo representa una dificultad grande para su tratamiento, lo que dificulta su contención y sumado a la presión con antibióticos de más amplio espectro para su tratamiento. Por ejemplo colistina y tigeciclina, que son antibióticos que deben ser reservados para microorganismos con resistencias naturales y solo deberían ser utilizados para productores de carbapenemasas como último recurso {Guzman-Blanco et al., 2014} {Petrosillo et al., 2013}. En nuestros aislamientos mostraron sensibilidad in vitro, sin embargo hay que tener en cuenta que ya se han reportado microorganismos portadores de KPC resistentes en Estados Unidos {Bratu et al., 2005}, Europa {Zarkotou et al., 2010} {Toth et al., 2010} Asia {Suh et al., 2010} y más recientemente en Suramérica {Nastro et al., 2013}.

Como una de las características a resaltar en nuestros aislamientos, fue la presencia de la enzima KPC-3 como única variedad encontrada en los hospitales estudiados, contrastando con lo reportado a nivel mundial donde la variante KPC-2 aporta la mayoría de casos de carbapenemasas a nivel hospitalario {Curiao et al., 2010} {Munoz-Price et

al., 2013}. En nuestro país en 2012 Mojica se reportó la presencia de KPC-2 y KPC-3 en varias especies de enterobacterias recuperadas durante el año 2009 en algunas ciudades de Colombia {Mojica et al., 2012}. Un reporte reciente presentó a *K. pneumoniae*, como la enterobacteria con mayor positividad para la portación de enzimas tipo con una prevalencia global de 17% en seis instituciones hospitalarias de cinco ciudades de Colombia {Pacheco R et al., 2014}. Hernández detectó un aumento en *K. pneumoniae* de 11% en 2009 a 15% en 2012 ($p < 0.001$) en 23 unidades de cuidado intensivo de 6 ciudades colombianas {Hernández-Gómez C et al., 2014}. De estas, el 68,4% fueron KPC positivo.

La prevalencia de este microorganismo en las instituciones hospitalarias de nuestro país, sumado a las características genotípicas descritas en este estudio, presentan un panorama de diseminación y mantenimiento en el tiempo. También plantean la necesidad de continuar vigilando el comportamiento de patógenos hospitalarios, ante cualquier cambio en su epidemiología.

La técnica de tipificación molecular PFGE permitió obtener un acercamiento al comportamiento de la diseminación global de los aislamientos, mostrando que un porcentaje importante de este tipo de microorganismos mantuvo sus características genéticas similares a través del tiempo y en diferentes lugares. Se encontraron aislamientos con más de 75% de similitud por PFGE los cuales pertenecieron al mismo ST, así mismo se presentaron aislamientos con diferentes patrones de PFGE, pero que también pertenecían al mismo ST. Similar a lo reportado previamente en aislamientos de *K. pneumoniae* portadores de KPC donde el ST258 también fue el único encontrado en los clones seleccionados. {Kitchel et al., 2009} {Mojica et al., 2012}.

El ST258 encontrado en nuestros aislamientos, hace parte del complejo clonal (CC) CC292 que ha demostrado su capacidad para diseminarse independientemente de las carbapenemasas KPC. Comúnmente presentan resistencia a aminoglucósidos y quinolonas y es una variante del también ampliamente diseminado ST-11. Ha sido reportado en USA, países europeos como Finlandia, Italia, Noruega, Polonia, Suecia e Israel sugiriendo intercambio intercontinental por viajeros y pacientes más que la repetida adquisición de plásmidos similares por un clon prevalente. {Navon-Venezia et al., 2009}. Este hallazgo en nuestros aislamientos nos permitió generar una imagen más completa y

mejor comprensión de la importancia de los clones de alto riesgo en la difusión local de la resistencia a los antibióticos en *K. pneumoniae* de Bogotá.

Comparando las características de los elementos genéticos de nuestros aislamientos KPC-3 con lo reportado en otras partes del mundo nos diferenciamos de lo reportado en Asia por Shen, donde se encuentra una ISKpn8 {Shen et al., 2009} pero es comparable con lo reportado en la mayoría de países de América Europa y África {Naas et al., 2008} con los cuales compartimos características del entorno genético de gen *bla_{KPC}* incluso sin ser de la misma variedad es decir KPC-2 o KPC-3. Recientemente Correa describió una alta diversidad genética entre aislamientos de *K. pneumoniae* recuperados de diferentes ciudades de Colombia {Correa A et al., 2013}, interesantemente los aislados de Ibagué y Medellín que portaban la enzima KPC-3 pertenecían a la isoforma a del Tn4401 (delección de 100pb), en contraste en este mismo reporte, el aislamiento seleccionado de Bogotá, correspondía a la isoforma b, la misma encontrada por nosotros. Sin embargo nuestros aislamientos se diferencian en que son negativos para CTX-M, pero positivos para TEM-1 Y SHV-12. La diversidad genética planteada para estos microorganismos los hace altamente importantes en temas de salud pública debido a su rápida diseminación y la capacidad de transferencia de los mecanismos de resistencia. Por ejemplo recientemente, se reportó la primera *Salmonella* Typhimurium con KPC-2 aislada precisamente en un hospital de Bogotá, la cual presumiblemente adquirió el mecanismo de resistencia de otra *Enterobacteriaceae* {Rodríguez et al., 2013}.

Las características anteriormente descritas nos mostraron un panorama inicial de diseminación clonal, con una adquisición de otros mecanismos que confirieran resistencia a varias familias de antibióticos. Debido a que en nuestro tercer objetivo pretendíamos relacionar las características de aislamientos que se diseminan y que pueden favorecer la subsistencia de clones o grupos clonales con los valores de CIM a diferentes antibióticos, se decidió evaluar otro tipo de elementos que pudieran contribuir a entender mejor estas relaciones.

Logramos demostrar la presencia de elementos genéticos como determinantes en el mantenimiento en el tiempo de estos clones en el ambiente hospitalario. Se encontró un integrón clase I que en nuestros aislamientos contiene genes que codifican para resistencia a trimetoprim y aminoglucósidos. Se ha reportado que la selección del casete

dfrA17 encontrado en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli*, se debe al uso de trimetoprim como opción terapéutica en el tratamiento de infecciones urinarias {Brolund et al., 2010}.

Los aminoglucósidos son antibióticos que se utilizan en algunos casos en el terapia combinada para el tratamiento de las infecciones asociadas al cuidado de la salud, la presión selectiva generada por ellos en el centro hospitalario puede explicar la presencia y permanencia de los genes de resistencia en las cepas de *K. pneumoniae*.

Espectinomicina y estreptomycinina son otro tipo de aminoglucósidos que actualmente son poco usados como opción terapéutica, pero se ha demostrado que los genes *aadA* como el encontrado en los aislamientos estudiados, pueden permanecer aun cuando no exista presión selectiva o cese el uso de estos antimicrobianos {White et al., 2001} {Pallecchi et al., 2007}. Adicionalmente cabe considerar que estos antibióticos son utilizados en la industria agrícola sin el control adecuado y pueden llegar a constituirse en fuente de conservación de este tipo de elementos genéticos capaces de permanecer en bacterias que hacen parte de la flora normal constituyéndose en potenciales transmisores de mecanismos de resistencia.

Otras determinantes de resistencia evaluados fueron las características de las porinas, en los aislamientos estudiados se demostraron variaciones genéticas que pueden afectar su expresión fenotípica. La cual típicamente se considerada como un mecanismo asociado a la disminución de sensibilidad a los antibióticos en este tipo de microorganismos.

La porina *OmpK35* es reportada en aislamientos con BLEE y aún no se ha relacionado con resistencia a carbapenémicos. En contraste la alteración de *OmpK36* afecta el comportamiento de las CIM frente a carbapenémicos en aislamientos portadores de betalactamasas, así los que tienden a expresar abundantemente esta porina presentan CIM más bajas frente a imipenem y más altas para ertapenem {Bratu et al., 2005} similar a lo encontrado en nuestros aislamientos donde ertapenem fue el antibiótico que mejor detecto la inefectividad de los carbapenémicos.

Aunque frecuentemente *OmpK37* no se expresa y su rol no está establecido en la resistencia frente a carbapenémicos {Domenech-Sanchez et al., 1999}, se ha visto que el restablecimiento de las porinas *OmpK36* y *OmpK37* mejora la susceptibilidad frente a ertapenem en aislamientos con KPC {Jacoby et al., 2004}.

En conclusión, este estudio presenta la diseminación clonal de *K. pneumoniae* que portan la carbapenemasa tipo KPC-3, pertenecientes al linaje clonal ST258 que característicamente presenta multiresistencia y se encuentra altamente diseminado en varios países del mundo. Los grupos identificados tienen características relacionadas con el incremento en las CIM frente a diferentes antibióticos; como la alteración de las porinas. También portan elementos que permiten la transmisión de genes de resistencia como el integrón clase I y plásmidos con capacidad de transferirse.

Esta caracterización realizada a nivel de laboratorio, aporta evidencia acerca de la situación a nivel de control de infecciones y de vigilancia en salud pública de la ciudad de Bogotá. Uno de los aportes de nuestros resultados, es que el abordar el diagnóstico de este tipo de enzimas de una forma integral y suficiente desde el laboratorio de microbiología, se puede llegar a establecer un comportamiento a nivel institucional con los recursos disponibles en nuestros hospitales.

Sin embargo, y teniendo en cuenta las altas CIM encontradas en nuestros aislamientos, sugerimos que los laboratorios de microbiología trabajen para el mejoramiento continuo de las técnicas de laboratorio, con el fin de poder generar datos que reflejen el valor real de la CIM. Debido a que por ejemplo, es más útil para el tratamiento tener un dato de CIM para meropenem de 256 µg/mL (Resistente) que un dato de ≥ 4 µg/mL, que aunque también se clasifica como resistente, genera incertidumbre, acerca de la posible utilización de este carbapenémico por ejemplo en terapias combinadas, que han demostrado ser efectivas cuando el microorganismo tiene CIM no tan elevadas.

Las características genéticas encontradas en nuestros aislamientos, reflejan que en nuestros hospitales se está generando el ambiente adecuado para la permanencia de este tipo de microorganismos en el tiempo, dinámica que le permite adquirir otro tipo de elementos de resistencia o virulencia que dificultan aún más su contención. La estandarización de técnicas para la detección y confirmación tempranas de estos perfiles

en los laboratorios de microbiología y la optimización de los procesos y flujos de información con los laboratorios de referencia, fortalecen los sistemas de vigilancia.

La necesidad de fortalecer las acciones conjuntas de vigilancia epidemiológica y de prevención frente a este tipo de microorganismos, debe ser una actividad prioritaria tanto de las instituciones como de los niveles regionales y nacionales de salud pública. Frente a la emergencia y diseminación de este tipo de resistencia con importante impacto clínico, es fundamental establecer políticas institucionales que permitan su contención. La definición de sistemas de vigilancia institucional, priorizando microorganismos con su marcador de resistencia por ejemplo SAMR, *Klebsiella* KPC, *Acinetobacter* resistente a carbapenémicos, *Clostridium difficile* de acuerdo con la epidemiología local, también se constituyen en una herramienta útil para el cumplimiento de objetivos de vigilancia.

Las estrategias de prevención de la diseminación de ERC se encuentran establecidas en varios países del mundo, demostrando su efectividad, si no necesariamente, en la erradicación de las ERC, sí han impactado favorablemente en la disminución de la transmisión de estos microorganismos {Schwaber et al., 2011}. Por ejemplo, para todas las instituciones hospitalarias, el CDC basa sus estrategias de control en los siguientes aspectos: fortalecimiento de higiene de manos, precauciones de contacto, monitoreo ante cualquier incremento en la frecuencia de ERC, racionalización en el uso de procedimientos invasivos, implementación de programas de gerenciamiento eficiente de antibióticos {Centers for Disease Control and Prevention, 2013}.

Además si la institución ya ha detectado una posible transmisión de estos patógenos o a pesar de las medidas anteriores no ha logrado contención se pueden considerar la inclusión de otras medidas complementarias como la vigilancia activa de los pacientes con factores de riesgo, al ingreso y los que van a ser remitidos o baños con clorhexidina al 2% entre otros {Centers for Disease Control and Prevention, 2013}.

Si bien algunas de las recomendaciones no son tan fáciles de adoptar, debido a nuestro sistema de salud y a la limitación de recursos, existen otras actividades que no son costosas y si pueden ayudar a prevenir la transmisión y diseminación de estos patógenos en nuestros centros de atención en salud. Por ejemplo la educación a los ciudadanos frente al uso prudente de los antibióticos, a los estudiantes de ciencias de la salud previo

al contacto con infecciones, pacientes, infecciones, microorganismos y mecanismos de resistencia. Así como al personal de las instituciones hospitalarias que desde sus diferentes especialidades, puede ayudar a diagnosticar, tratar, contener y vigilar la emergencia y diseminación de estos mecanismos de resistencia.

Todo encaminado a no seguir incluyéndonos en la lista de países endémicos para tal o cual enfermedad, sino de aparecer como pioneros en la disminución de tasas de ERC, un ejemplo de manejo prudente y adecuado de antibióticos, un país que trabaje con técnicas de diagnóstico estandarizadas y porque no el primer país del mundo sin KPC

5.Anexo A:

- **Protocolo para el desarrollo de la técnica de PFGE en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae***

Se anexa CD con el anexo.

6. Anexo B

- **Protocolo de laboratorio para la determinación de tipo de secuencia MLST para en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae***

Se anexa CD con el anexo.

7.Anexo: C

- **Secuencia obtenida para *bla*_{TEM-1} (*Klebsiella pneumoniae* H4)- 861pb**

ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCTGTTTTT
GCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGT
TACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTT
CAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCA
AGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACA
GAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTG
ATAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT
GCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT
ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATT
AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAA
GTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGA
GCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCG
TATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCT
GAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA

8. Anexo D:

- **Secuencia obtenida para *bla*_{SHV-12} (*Klebsiella pneumoniae* H4)- 861pb**

ATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACCCTGCCGCTGGCGGTACACGCCA
GCCCCGAGCCGCTTGAGCAAATTAACAAAGCGAAAGCCAGCTGTCTGGGCCGCGTAGGCATG
ATAGAAATGGATCTGGCCAGCGGCCGCACGCTGACCGCCTGGCGCGCCGATGAACGCTTTCC
CATGATGAGCACCTTTAAAGTAGTGCTCTGCGGCGCAGTGCTGGCGCGGGTGGATGCCGGTG
ACGAACAGCTGGAGCGAAAGATCCACTATCGCCAGCAGGATCTGGTGGACTACTCGCCGGTCA
GCGAAAAACACCTTGCCGACGGCATGACGGTTCGGCGAACTCTGCGCCGCGCCATTACCATG
AGCGATAACAGCGCCGCAATCTGCTGCTGGCCACCGTCGGCGGCCCGCAGGATTGACTGC
CTTTTTGCGCCAGATCGGCGACAACGTCACCCGCCTTGACCGCTGGGAAACGGAACGAATGA
GGCGCTTCCCGGCGACGCCCGGACACCACTACCCGGCCAGCATGGCCGCGACCCTGCGC
AAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTCGCAACGGCAGCTGCTGCAGTGGATGGT
GGACGATCGGGTCGCCGACCGTTGATCCGCTCCGTGCTGCCGCGGGGCTGGTTTATCGCCG
ATAAGACCGGAGCTAGCAAGCGGGGTGCGCGCGGGATTGTGCCCTGCTTGGCCGAATAAC
AAAGCAGAGCGCATTGTGGTGAATTTATCTGCGGGATACGCCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAAT
CAGCAAATCGCCGGGATCGGCGCGGCGCTGATCGAGCACTGGCAACGCTAA

9. Anexo E:

- **Integron de clase 1 (Aislado *Klebsiella pneumoniae* K45) - 2237pb**

AACCTTGCGCTCGTTCGCCAGCCAGGACAGAAATGCCTCGACTTCGCTGCTGCCAAGGTTGCCGGT
GACGCACACCGTGAAACGGATGAAGGCACCATCCCAGTGGACATAAGCCTGTTGCGTTGGTAAGCTG
TAATGCAAGTAGCGTATGCGCTCACGCAACTGGTCCAGAACCTTGACCGAACGCGGGCGGTGGTAACGG
CGCAATGGCGGTTTTTCATGGCTTGTATGACTGTTTTTTTTGTACAGTCTATGCCTCGGGCATCCAAGCAA
CAAGCGCGTTACGCCGTGGGTaGATGTTTGATGTTATGGAGCAGCAACGATGTTACGCAGCAGGGCAGT
CGCCCTAAAACAAAGTTAGCCATATGAACTCGGAATCAGTACGCATTTATCTCGTTGCTGCGATGGGAGC
CAATCGGGTTATTGGCAATGGTCCTAATATCCCCTGGAAAATTCGGGTGAGCAGAAGATTTTTCGCAGA
CTCACTGAGGGAAAAGTCGTTGTCATGGGGCGAAAGACCTTTGAGTCTATCGGCAAGCCTCTACCGAAC
CGTCACACATTGGTAATCTCACGCCAAGCTAACTACCGCGCCACTGGCTGCGTAGTTGTTTCAACGCTGT
CGCAGCTATCGCTTTGGCATCCGAACTCGGCAATGAACTCTACGTGCGGGCGGAGCTGAGATATACA
CTCTGGCACTACCTCacgaCGcCTGACGGCGTGTCTATCTGAGGCACAGCTCAAACCTTCGAGGGTG
ACGCCCTTCTCCCAATGCTACGAAACAggAATTCGAGCTTGTCTCAACCGAAACCATTCAAGCTGTAATTC
CGTACACCCACTCCGTTTATGCGCGTCGAAACGGCTAACCATTCCGTCAACGGGACGCCAAAATGCTGC
GCATTTTGGTTCCTCCGCTGCGCTCCGGCTCTCGTTACGTCCAACGTTAGCACCACTGAAACCCAGCT
TTATTTAGCTCATGTTTATTCAAACGGCATTAGCTTTTTAGGGCATTATCAGTGCCTGTTTTGCCTTTTTT
CCGGGCTTCGCCTGCATGGGCTGCGCAGGTTTTAGTCTTTTTGGCCTCTAGCCCTTGCCTAGCAAGCG
CAAGCAGCTATCGTTTTTGCAGTGTGTGCCGCTCGGTGGCGCAGCGTTTTTTCACGGTTAGCGCCCG
TCGCCAAATTCAAGTTATCCGTTTTGGCTTCTGGTTCTAACATTTCCGTCAAGCCGACCCGATTCTGCG
GTCCGGCTTACCTCGCCGTTAGACATCATGAGGGAAGCGGTGACCATCGAAATTTGAACCAACTATCA
GAGGTGCTAAGCGTCATTGAGCGCCATCTGGAATCAACGTTGCTGGCCGTGCATTTGTACGGCTCCGCA
GTGGATGGCGGCCTGAAGCCATACAGCGATATGATTTGTTGGTACTGTGACAGTAAAGCTGGATGAAA
CGACGCGGCGAGCATTGCTCAATGATCTTATGGAGTTTTCGGCTTTACCTGGCGAGAGCGAGACGCTC
CGCGCTATAGAAGTCACCCTTGTGCTGCATGTGACATCATCCCGTGGCGTTATCCGGCTAAGCGCGAG
CTGCAATTTGGAGAATGGCAGCGCAATGACATCTTGGGGTATCTTCGAGCCAGCCATGATCGACATT
GATCTAGCTATCCTGCTTACAAAAGCAAGAGAACATAGCGTTGCCTTGGTAGGTCCGGCAGCGGAGGAA
TTCTTTGACCCGGTTCCTGAACAGGATCTATTCGAGGCGCTGAGGGAAACCTTGAAGCTATGGAACCTCG
CAGCCCGGCTGGGCCGGCGATGATCGAAATGTAGTGCTTACGTTGTCCCGCATTTGGTACAGCGCAATA
ACCGGCAAAATCGCGCCGAAGGATGTGCTGCCGACTGGGCAATAAAACGCCTACCTGCCAGTATCA

GCCCGTCTTACTTGAAGCTAAGCAAGCTTATCTGGGACAAAAAGAAGATCACTTGGCCTCACGCGCAGA
TCACCTGGAAGAATTTATTCGCTTTGTGAAAGGGAGATCATCAAGTCAGTTGGTAAATGATGTCTAACAAT
TCGTTCAAGCCGACCGCGCTACGCGCGGGGCTTAACTCCGGCGTTAGATGCCCTAAGCACATAATTGC
TCACAGCCACTATCAGGTCAAGTCTGCTTTTATTTATTTTAAAGCGTGCATAATAAGCCCTACACAAATTG
GGAGATATATCATGAAAG

10. ANEXO F:

- **Secuencia obtenida para *OmpK35* (*Klebsiella pneumoniae* H4) - 1081pb**

ATGATGAAGCGCAATATTCTGGCAGTGGTATCCCTGCCCTGCTGGTAGCCGGTGCAGCCAACGCTGCAGAAATCTAT
AACAAAAACGGCAACAACTGGACTTCTATGGAAAAATGGTCGGGCGAGCACGTCTGGACCACCAATGGCGACACCA
GCAGCGACGATACCACCTATGCCCGTATCGGCCCTGAAAGGCGAAACTCAGATCAACGATCAGCTGATCGGCTACGGC
CAGTGGGAATACAACATGGACGCGTCCAATGTTGAAGGTTCCAGACCACAAAAACCCGTCTAGCGTTCGCAGGCCTG
AAAGCGGGCGAATACGGTTCATTGACTATGGCCGTAACGCGCGATCTACGACGTCGAAGCGGCAACCGATAT
GCTGGTTGAATGGGGCGGTGACGGCTGGAACATAACGACAACATACATGACCGGTCGTACCAACGGCGTCGCAACCT
ACCGTAACCTCCGACTTCTCGGTCTGGTTGACGGTCTGAGCTTCGCGCTGCAGTACCAGGGTAAAAACGACCATGACC
GTGCGATTGCAAGCAGAATGGCGACGGCTTCAGCACCAGCCACCTACGCGTTCGACAACGGTATCGCACTGTCT
GCAGGCTACTCCAGCTAACCCTAGCGTCGATCAGAAAGCTGACGGCAATGGCGACAAAGCCGAAGCCTGGGCGAC
CTCTGCAAAATATGACGCTAACAACATCTATGCGGCCGTATGTACTCCAGACTTACAACATGACTCCGGAAGAAGAT
AACCCTTCGCTGGTAAACTCAGAACCTTGAAGCAGTTGTACAGTATCAGTTTGACTTCGGCCTGCGTCCGTCATCG
GCTACGTACAGACCAAAGGCAAGGACCTGCAGTCGCGTGTGGCTTCTCCGGCGGCGATGCGGATCTGGTTAATAC
ATCGAAGTGGGTACCTGGTACTACTTTAACAAAGAACATGAACGCTACGCTGCGTATAAATCAACCAGCTGGACGACA
ACGATTACACCAAAGCGGCTGGTGTGCCACTGACGACCAGGCGGCCGTGGGTATCGTTTACCAGTTCTAA

En el recuadro se observa la inserción de un nucleótido (G) en la posición 121 generando un codón de parada prematuro.

Klebsiella pneumoniae JM45, complete genome
Sequence ID: [gb|CP006656.1|](#) Length: 5273813 Number of Matches: 1

Range 1: 3372350 to 3373429 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1989 bits(1077)	0.0	1080/1081(99%)	1/1081(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGATGAAGCGCAATATTCTGGCAGTGGTATCCCTGCCCTGCTGGTAGCCGGTGCAGCCAACGCTGCAGAAATCTAT			60
Sbjct 3372350	ATGATGAAGCGCAATATTCTGGCAGTGGTATCCCTGCCCTGCTGGTAGCCGGTGCAGCCAACGCTGCAGAAATCTAT			3372409
Query 61	AACGCTGCAGAAATCTATAACAAAAACGGCAACAACTGGACTTCTATGGAAAAATGGTC			120
Sbjct 3372410	AACGCTGCAGAAATCTATAACAAAAACGGCAACAACTGGACTTCTATGGAAAAATGGTC			3372469
Query 121	GGCGAGCACGCTCTGGACCAACCAATGGCGACACCAGCAGCGACGATACCACCTATGCCCG			180
Sbjct 3372470	-GGCGAGCACGCTCTGGACCAACCAATGGCGACACCAGCAGCGACGATACCACCTATGCCCG			3372528
Query 181	TATCGGCCCTGAAAGGGGGAACCTCAGATCAACGATCAGCTGATCGGCTACGGCCAGTGGGA			240
Sbjct 3372529	TATCGGCCCTGAAAGGGGGAACCTCAGATCAACGATCAGCTGATCGGCTACGGCCAGTGGGA			3372588
Query 241	ATACACATGAGCGCGCTCCATGTTGAAAGGTTCCCGAGCACAAAAACCGCTTAGCGTT			300
Sbjct 3372589	ATACACATGAGCGCGCTCCATGTTGAAAGGTTCCCGAGCACAAAAACCGCTTAGCGTT			3372648
Query 301	CCGAGGCTGAAAGCGGGGGAATACGGTTCATTCCGACTATGGCCGTAACTACGGCCGAT			360
Sbjct 3372649	CCGAGGCTGAAAGCGGGGGAATACGGTTCATTCCGACTATGGCCGTAACTACGGCCGAT			3372708
Query 361	CTACGACGTCGAAAGCGGCAACCGATATGCTGGTGAATGGGCGGCTGACGGCTGGAACTA			420
Sbjct 3372709	CTACGACGTCGAAAGCGGCAACCGATATGCTGGTGAATGGGCGGCTGACGGCTGGAACTA			3372768
Query 421	TACCGAANCTACATGACCGGTGGTACCAGCGGCTCCCACTAACCGTAACTCCGACTT			480
Sbjct 3372769	TACCGAANCTACATGACCGGTGGTACCAGCGGCTCCCACTAACCGTAACTCCGACTT			3372828
Query 481	CTTCGGTCTGGTGAAGGCTCTGAGCTTCGCGCTCCAGTACCAAGGTAATAACGACCATGA			540
Sbjct 3372829	CTTCGGTCTGGTGAAGGCTCTGAGCTTCGCGCTCCAGTACCAAGGTAATAACGACCATGA			3372888
Query 541	CCGTGGATTCGCAAGCAGAAATGGCGAAGGCTTCAGCAACCGCAGCCACCTACGGCTTGA			600
Sbjct 3372889	CCGTGGATTCGCAAGCAGAAATGGCGAAGGCTTCAGCAACCGCAGCCACCTACGGCTTGA			3372948
Query 601	CAACGGTATCCGACTGTCTGCAGGCTACTCCAGCTCTAACCGTAGCGGTGATCAGAAAGC			660
Sbjct 3372949	CAACGGTATCCGACTGTCTGCAGGCTACTCCAGCTCTAACCGTAGCGGTGATCAGAAAGC			3373008
Query 661	TGACGGCAATGGCGCAAAAGCGAAGCCTGGGCGACCTCTGCAAAATATGACGCTAACAA			720
Sbjct 3373009	TGACGGCAATGGCGCAAAAGCGAAGCCTGGGCGACCTCTGCAAAATATGACGCTAACAA			3373068

11. ANEXO G:

- **Secuencia obtenida para *OmpK36* (*Klebsiella pneumoniae* H4) 1110 pb**

ATGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTCCTGGTACCGGCTCTGCTGGTAGCAGGCGCAGCAAATGCGGCTGAAATTTATAAC
 AAAGACGGCAACAAATTAGACCTGTACGGTAAAATTGACGGTCTGCACTACTTCTCTGACGACAAGAGCGTGCACGGC
 GACCAGACCTACATGCGTGTAGGCGTGAAAGGCGAAACCCAGATCAACGACCAGCTGACCGGTTACGGCCAGTGGGA
 ATACAACGTTACGGCGAACAACTGAAAGCTCCAGCGATCAGGCATGGACTCGTCTGGCATTGCGAGGCCTGAAATT
 TGGCGACGCGGGCTCTTTGACTACGGTCTGTAACACTACGGCGTAGTATACGACGTAACGTCTGGACCGACGTTCTGC
 CGGAATTCGGCGGGCAGACCCGACACCTACGGTTCTGACAACCTCTGCACTCCCGTGTAACGGCGTTGCAACCTAC
 CGTAACTCTGATTTCTCGGTCTGGTTGACGGCTGAACTTTGCTCTGCAGTATCAGGGTAAAAACGGCAGCGTCAGC
 GGCGAAGGCGCTCTGTCTCTACCAACAACGGTCTGACCGCCTTGAACAGAACGGCGACGGTTACGGTACTTCTCT
 GACCTATGACATCTATGATGGCATCAGCGCTGGTTTCGCATACTAACTCCAAACGTCTTGGCGACCAGAACAGCAA
 GCTGGCACTGGTCTGGCGACAACGCTGAAACCTACACCGGCGGTCTGAAATACGACGCGAACAACATCTACCTGG
 CCACTAGTACACCCAGACCTACAACGCGACCCGCGCCGGTTCCCTGGGCTTTGCTAACAAAGCGCAGAACTTCGAA
 GTGGTTGCTCAGTACCAGTTCGACTTCGGTCTGCGTCCGTCCGTGGCTTACCTGCAGTCTAAAGGTAAGGATCTGGAA
 GGCTACGGCGACCAGGACATCTGAAATATGTTGACGTTGGCGGACCTACTACTTCAACAAAAACATGTCCACCTAT
 GTTGACTACAAAATCAACCTGCTGGACGACAATAGCTTCACCCACAACGCCGGTATCTCTACCGACGACGTGGTTGCA
 CTGGGCTGGTTACCAGTTCTAA

En el recuadro se observa una inserción de 6 nucleótidos (GACACC) en la posición 409.

Klebsiella pneumoniae JM45, complete genome
 Sequence ID: [gb|CP006656.1|](#) Length: 5273813 Number of Matches: 1

Range 1: 1642226 to 1643329 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2012 bits(1089)	0.0	1104/1110(99%)	6/1110(0%)	Plus/Plus

Features: [OmpK36](#)

```

Query 1      ATGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTCCTGGTACCGGCTCTGCTGGTAGCAGGCGCAGCAAATGCGGCTGAAATTTATAAC 60
Sbjct 1642226 ATGAAAGTTAAAGTACTGTCCCTCCTGGTACCGGCTCTGCTGGTAGCAGGCGCAGCAAAT 1642285

Query 61     GCGGCTGMAATTTATACAAAGACGGCCACAAATTAGAOCCTGTACGGTAAATTTGACGGT 120
Sbjct 1642286 GCGGCTGMAATTTATACAAAGACGGCCACAAATTAGAOCCTGTACGGTAAATTTGACGGT 1642345

Query 121    CTGCCTACTTCTCTGACGACAGAGGCTGACGGCGACGACCTAGATCGCTGTAGGC 180
Sbjct 1642346 CTGCCTACTTCTCTGACGACAGAGGCTGACGGCGACGACCTAGATCGCTGTAGGC 1642405

Query 181    GTGAAAGGCGAAACCCAGATCAACGACAGCTGACCGGTTACGGCCAGTGGGAATCAAC 240
Sbjct 1642406 GTGAAAGGCGAAACCCAGATCAACGACAGCTGACCGGTTACGGCCAGTGGGAATCAAC 1642465

Query 241    GTTCAGGCGAACAACTGMAAGCTCCAGCGATCAGGCATGGACTCGTCTGGCATTCGCA 300
Sbjct 1642466 GTTCAGGCGAACAACTGMAAGCTCCAGCGATCAGGCATGGACTCGTCTGGCATTCGCA 1642525

Query 301    GGCCTGAAATTTGGCGACCGGGCTCTTTGACTACGGTCTGTAACACTACGGCTAGTATAC 360
Sbjct 1642526 GGCCTGAAATTTGGCGACCGGGCTCTTTGACTACGGTCTGTAACACTACGGCTAGTATAC 1642585

Query 361    GACGTAACTCTCTGGACCGAAGCTTCTGCGGMAATTCGGCGGACACCGACACCTACGGT 420
Sbjct 1642586 GACGTAACTCTCTGGACCGAAGCTTCTGCGGMAATTCGGCGG-----CGACACCTACGGT 1642639

Query 421    TCTGACAACTTCTCTGCGTCCCGTCTGAAACGGGCTGCAACCTACCGTAACTCTGATTC 480
Sbjct 1642640 TCTGACAACTTCTCTGCGTCCCGTCTGAAACGGGCTGCAACCTACCGTAACTCTGATTC 1642699

Query 481    TTGGTCTGGTTGACGGCCTGMACTTTGCTCTGCAATACAGGGTAAAAACGGCAGGCTC 540
Sbjct 1642700 TTGGTCTGGTTGACGGCCTGMACTTTGCTCTGCAATACAGGGTAAAAACGGCAGGCTC 1642759

Query 541    AGCGGCGAAGGCGCTCTGCTCTCTACCAACAACGGTCTGACCGCTGMAACAGAACGGC 600
Sbjct 1642760 AGCGGCGAAGGCGCTCTGCTCTCTACCAACAACGGTCTGACCGCTGMAACAGAACGGC 1642819

Query 601    GACGGTTACGGTACTTCTGACCTATGACATCTATGATGGCATCAGCGCTGGTTTCGCA 660
Sbjct 1642820 GACGGTTACGGTACTTCTGACCTATGACATCTATGATGGCATCAGCGCTGGTTTCGCA 1642879

Query 661    TACTCTAACTCCAAACGCTCTTGGCGACGACAGCAAGCTGGACCTGGGCTCTGGGAC 720
Sbjct 1642880 TACTCTAACTCCAAACGCTCTTGGCGACGACAGCAAGCTGGACCTGGGCTCTGGGAC 1642939
    
```

12. ANEXO H:

- **Secuencia obtenida para *OmpK36* (*Klebsiella pneumoniae* K8) - 1104pb**

ATGAAAGTTAAAGTATTGTCCCTCCTGGTACCGGCTCTGCTGGTAGCAGGCGCAGCAAATGCGGCTGAAATTTATAACA
AAGACGGCAACAAATTAGACCTGTACGGTAAAATTGACGGTCTGCACTACTTCTCTGACGACAAGAGCGTCGACGGCG
ACCAGACCTACATGCGTGTAGGCGTGAAAGGGCGAAACCCAGATCAACGACCAGCTGACCGGTTACGGCCAGTGGGAA
TACAACGTTTCAGGCGAACAACTGAAAGCTCCAGCGATCAGGCATGGACTCGTCTGGCATTTCGAGGCCTGAAATTT
GGCGACGCGGGCTCTTTCGACTACGGTCTGAACTACGGCGTAGTATACGACGTAACGTCCTGGACCGACGTTCTGCC
GGAATTCGGCGGGCAGACCTACGGTTCTGACAACTTCTCGAGTCCCGTGCTAACGGCGTTGCAACCTACCGTAACTC
TGATTTCTTCGGTCTGGTTGACGGCCTGAACCTTGTCTGACAGTATCAGGGTAAAAACGGCAGCGTCAGCGGCGAAGG
CGCTCTGTCTCTACCAACAACGGTCTGACCGCTTGAACAGAACGGCGACGTTACGGTACTTCTCTGACCTATGA
CATCTATGATGGCATCAGCGCTGGTTTCGCATACTTAACCTCAAACGCTCTTGGCGACCAGAACAGCAAGCTGGCACT
GGGTCGTGGCGACAACGCTGAAACCTACACCGGCGGTCTGAAATACGACGCGAACAACATCTACCTGGCCACTCAGT
ACACCCAGACCTACAACGCGACCCGCGcCGGTTCCCTGGGCTTTGCTAACAAAGCGCAGAACTTGAAGTGGTTGCTC
AGTACCAGTTCGACTTCGGTCTGCGTCCGTCGGTACCTGCAGTCTAAAGGTAAGGATCTGGAAGGCTACGGCG
ACCAGGACATCTGAAATATGTTGACGTTGGCGCGACCTACTACTtCAACAAAACATGTCCACCTATGTTGACTACAAA
ATCAACCTGCTGGACGACAATAGCTTACCCACAACGCCGGTATCTCTACCGACGACGTGGTTGCACTGGGCCTGGT
TACCAGTTCTAA

En el recuadro se observa una mutación puntual.

Download ▾ GenBank Graphics

Klebsiella pneumoniae JM45, complete genome
Sequence ID: [gb|CP006656.1](#) Length: 5273813 Number of Matches: 1

Range 1: 1642226 to 1643329 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2034 bits(1101)	0.0	1103/1104(99%)	0/1104(0%)	Plus/Plus

Features: [OmpK36](#)

Query	1	ATGAAAGTTAAAGTATTGTCCCTCCTGGTACCGGCTCTGCTGGTAGCAGGCGCAGCAAATGCGGCTGAAATTTATAACA	60
Sbjct	1642226	ATGAAAGTTAAAGTATTGTCCCTCCTGGTACCGGCTCTGCTGGTAGCAGGCGCAGCAAATGCGGCTGAAATTTATAACA	1642285
Query	61	GCGGCTGAAATTTATACAAAGACGGCGAACAAATTAGACCTGTACGGTAAAAATTGACGGT	120
Sbjct	1642286	GCGGCTGAAATTTATACAAAGACGGCGAACAAATTAGACCTGTACGGTAAAAATTGACGGT	1642345
Query	121	CTGCCTACTTCTCTGACGACAAGAGCGCTGACGCGGACCGACCTACATGCGTGTAGGC	180
Sbjct	1642346	CTGCCTACTTCTCTGACGACAAGAGCGCTGACGCGGACCGACCTACATGCGTGTAGGC	1642405
Query	181	GTGAAAGGCGAANCCAGATCAACGACCGCTGACCGGTTACGGCCAGTGGGAAATACAAAC	240
Sbjct	1642406	GTGAAAGGCGAANCCAGATCAACGACCGCTGACCGGTTACGGCCAGTGGGAAATACAAAC	1642465
Query	241	GTTTCAGGCGAACACACTGAAAGCTCCAGCGATCAGGCATGAGCTGCTGGCATTCGCA	300
Sbjct	1642466	GTTTCAGGCGAACACACTGAAAGCTCCAGCGATCAGGCATGAGCTGCTGGCATTCGCA	1642525
Query	301	GGGCTGAAATTTGGGCGACGGGGCTCTTTGACTACGGTCTGACTACGGGCTAGTATAC	360
Sbjct	1642526	GGGCTGAAATTTGGGCGACGGGGCTCTTTGACTACGGTCTGACTACGGGCTAGTATAC	1642585
Query	361	GACGTACGCTCTGACCGGACGCTTCTGCGGAAATTCGGGCGGACACCTACGGTCTGAC	420
Sbjct	1642586	GACGTACGCTCTGACCGGACGCTTCTGCGGAAATTCGGGCGGACACCTACGGTCTGAC	1642645
Query	421	AACTTCTGCACTCCCGTCTAAGCGGCTTGCACCTACCGTAACTCTGATTTCTCGGT	480
Sbjct	1642646	AACTTCTGCACTCCCGTCTAAGCGGCTTGCACCTACCGTAACTCTGATTTCTCGGT	1642705
Query	481	CTGGTTGACGGGCTGAACTTGTCTCTGATATCAGGTTAAAAACGGCAGCGTCAGCGGC	540
Sbjct	1642706	CTGGTTGACGGGCTGAACTTGTCTCTGATATCAGGTTAAAAACGGCAGCGTCAGCGGC	1642765
Query	541	GAAAGGCGCTCTGTCTCTACCAACAAACGGTCTGACCGCTTGAACAGAACGGCGACGGT	600
Sbjct	1642766	GAAAGGCGCTCTGTCTCTACCAACAAACGGTCTGACCGCTTGAACAGAACGGCGACGGT	1642825
Query	601	TACGGTACTTCTCTGACCTATGACATCTATGATGGCATCAGCGCTGGTTTCCACTACTCT	660

13. ANEXO I:

- **Secuencia obtenida para *OmpK37* (*Klebsiella pneumoniae* H4) - 1115pb**

ATGAAAAGAAAAGTACTGGCCCTCGTTATTCCGGCTTTATTAGCCGCCGGTGCCGCGCATGCGGCGGAAATTTATAAT
 AAAGACGGGAATAAATTAGATCTCTATGGCAAGGTAGATGGTCTGCATTATTTCTCCAGCGACTCGAAAAAGACGGCG
 ATCAAACCTATTTACGTTTTGGCTTTAAAGGCGAAACCCAGATCAACGATATGCTTACCGGCTATGGCCAGTGGGAATA
 TAACGTTACAGGCCAACACACCGAGACCTCCAGCGATCAGGCGTGACCCCGTCTGGCATTGCGCGGTATCAAAGTGG
 GCGATTACGGCTCCTTCGACTACGGTCGTAACACTACGGCGTGCTGTACGACGTTGAAGGCTGGACCGATATGCTGCCG
 GAGTTCGGCGGCGACTCCTACACCTATGCGGATAACTTTATGGCAGGCCGCGCCAACGCGCTCGCAACCTACCGCAA
 CAGCGATTTCTCGGTCTGGTGGAGGTCTGAACTTCGCCCTGCAGTATCAGGGTAAAAACGAAGGCCAGAACGCGC
 AGGATATCAACGTCGGACCAATAACCGCAGCAGCGACAGCGATGTTTCGCTTCGACAATGGCGATGGTTTCGGCCTCT
 CCACTTCTACGACTTCGGCATGGGTATCAGCGCGGCGGAGCTTACACCTCGTCTGACCGTACAGGGCAGCAGCAA
 CACTATACTCACACCGAACGATACGCCAAAGGCGACAAAGCGGACGCGCTGGACCGCCGGCCTGAAAGTACGACGCCAA
 CGATATTTACCTGGCGACCATGTACTCTGAAACCCGCAATATGACGCCATACGGCTCTACCAGCAGTACCAACGGTGG
 CGGTATCGCCAATAAAACGCAAAACTTCGAAATCACCGCGCAGTATCAGTTCGACTTCGGCCTGCGTCCGGCCATCTC
 CTACCTGCAGTCCAAAGGCAAAGATCTGTACAATAACGGCCGCTATGCCGATAAAGATCTGGTCAAATATATGGACGTT
 GCGCGACCTATTACTTCAACCGTAATATGTCCACCTATGTTGATTACAAAATCAACCTGCTGGATGGTAACGACAAAAT
 CTACGAAGACAACGGTATCTCTACCGATAACATCGTCCGCCCTGGGCTGGTTTACCAGTTCTGA

En el recuadro se observa la identidad 100% de la secuencia obtenida con un gen completo de *OmpK37* de una *K.pneumoniae*.

Download ▾ GenBank Graphics

Klebsiella pneumoniae strain JIE2713 clone 2713-K37 *OmpK37* (*ompK37*) gene, complete cds
 Sequence ID: [gb|KC534871.1](#) Length: 1155 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1155 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2134 bits(1155)	0.0	1155/1155(100%)	0/1155(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGAAAAGAAAAGTACTGGCCCTCGTTATTCCGGCTTTATTAGCCGCCGGTGCCGCGCATGCGGCGGAAATTTATAAT			60
Sbjct 1	ATGAAAAGAAAAGTACTGGCCCTCGTTATTCCGGCTTTATTAGCCGCCGGTGCCGCGCATGCGGCGGAAATTTATAAT			60
Query 61	GCGGCGGAAATTTATAAATANGACGGGAAATTAATAGATCTCTATGGCAAGGTAGATGGT			120
Sbjct 61	GCGGCGGAAATTTATAAATANGACGGGAAATTAATAGATCTCTATGGCAAGGTAGATGGT			120
Query 121	CTGCATTATTTCTCCAGCGACTCGAAAAAGACGGGATCAAACTTATTTACGTTTGGC			180
Sbjct 121	CTGCATTATTTCTCCAGCGACTCGAAAAAGACGGGATCAAACTTATTTACGTTTGGC			180
Query 181	TTTAAAGGCGAAACCCAGATCAACGATATGCTTACCGGCTATGGCCAGTGGGAATATAAC			240
Sbjct 181	TTTAAAGGCGAAACCCAGATCAACGATATGCTTACCGGCTATGGCCAGTGGGAATATAAC			240
Query 241	GTTCAAGCCACACACCGGAGCCTCCAGCGATCAGGCGTGGACCCGCTGCGCATTCGCC			300
Sbjct 241	GTTCAAGCCACACACCGGAGCCTCCAGCGATCAGGCGTGGACCCGCTGCGCATTCGCC			300
Query 301	GGTATCAANGTGGGCGATTACGGCTCCTTCGACTACGGTGTGTAACACGGGCTGCTGTAC			360
Sbjct 301	GGTATCAANGTGGGCGATTACGGCTCCTTCGACTACGGTGTGTAACACGGGCTGCTGTAC			360
Query 361	GACGTTGAAGGCTGGACCGATATGCTGCGCGAGTTGCGGCGGACTCCTACACCTATGCG			420
Sbjct 361	GACGTTGAAGGCTGGACCGATATGCTGCGCGAGTTGCGGCGGACTCCTACACCTATGCG			420
Query 421	GATAACTTTATGGCAGGCGCGCCAAACGGCGTCCAACTACCGCAACAGGATTTCTTC			480
Sbjct 421	GATAACTTTATGGCAGGCGCGCCAAACGGCGTCCAACTACCGCAACAGGATTTCTTC			480
Query 481	GGTCTGGTGGAGGGTCTGAACTTCGCCCTCGAGTATCAGGGTAAAAACGAAGGCCAGAAC			540

14. Anexo J:

- **Contexto Genético *bla*_{KPC-3} (Aislado *Klebsiella pneumoniae* H4) - 2865pb**

AGCTCATCCGCAGCATCTACACGCTTCGCTACCTGCGCGATCCGCAACTGGAACGCAACGTGCACCGCTCGCAAAA
 TCGCCTCGAGTCTACCATCAGCTACGCTCGGCCATTGCCAGGTCGGCGGTAAGAAGGAAGTACCCGGTTCGCAC
 CGACATTGAAATCGAGATCAGCAACCAAGTGCACGCGCTGATCGCCAACACGATCATTTTTCTACAACCTCGGCAATCT
 TGTCGCGGCTGGTGACCAAGTACGAGGCGGCCGGCAACAGCAAGGCGCTGGCACTCATCACAAAAATTTGCGCTG
 CGGCATGGCGGCACATCCTGCTCAACGGGCACTACACCTTTCAAAGCAGCGGCAAGACGATCGATCTCGATGCGA
 TCGTTCGAGGCCTGGAAGTGGAGTGACGGAATTTTCAGCGTTCCGTGTTAGCAGCASTGAAAAGTACCCACCC
 CAGCGAAGTAAAAGTATCCACCTGGGCTAGTTTGGCGGCTTTTCGAGGCCGTCGATGTTGACCCAGGAGCAAAC
 CGTGGAATCAGAGTTCTTGCCCGACAGGGCACTCCATCCGGCACATCGCCCGCACGTTGGGGTCTCGCGCAA
 TACCGTGCGCCGCTACCTCCGCGATCCGTCGGTAGCGGATACCAGCCCCGTGAACCACGCCCCACCAAAGTGGG
 GCCATTTGAATCTTATCTGCGGCAACGGGTGAGCAGGCCACCCCATCTGGCTGCCTGCCACCGTCTGAATCG
 GGAAATCCGCGCTCAAGGTATGGCGCGGTCTCTCGTTATTGCGCGCTTCTCGCCACGCTCAAGCCCGCCCG
 CCGCGAAGCAGGTCGGCCGTCGTTTCGAGACCGAGCCCGGACGGCAGTTGCAGGCTGATTCGTGGTCTTGC
 GCCGGGCCAGATCCCCATGTCGGCTTCGTCGCCACGCTGGGATACAGCCGCATGACGTTTGTACCTTCGTAC
 CGGACGAATCCTTCGAGTCCGTGCGGGACTCCCTGTTGCTGGCTTTTACTATCTGGGCGGTGTGCCCGCGAGG
 TGTTGTTTCGACAACATGAAGACCGTGGTGTGGAACGCGATGCCTACGGTGACGGCAAGCACCGTTTTACCCCG
 GCTTGCTTCAACTGGCCGATGACCTGGGGTTCGGATCCGGCTGTGTCGCCCGTATCGGGCCAGACCAAAGGCA
 AGGTCGAGCGCTTCAATCGCTACTTCCGCGAGAGCTTCTACAACCCGTTGCTGACCCGGATGAAGGGCACGGGGC
 TGCTGCTCGATTGTGCTGCTGCCAACCAGCGCTCCGTGACTGGTTGGCAGACGAGGCGAATGTGCGGGTCCACG
 CCACCCTGAACGAGCGCCCCATCGACCGTTGGCGGCAGGAGCGGGAACACCTGCAACCCTTGCATCCCGTGTG
 CGGCGCGACGAGGCCCCCTGCTGGATAACAGTCTCCGCCCGGTACCCTGGAATCTCTCCAGCACCCACTGTCT
 GTCTATGACGCAATTGGGGAGGCCTGCCGATGAACCTCCAGCATGAGCGGATCGACGCCCTGTGCCAGCAACTCA
 AACTCGAACGGGTGGCAACGCATTACCCCGTCTGGCGCAGCAGGCGGTGCGCGAGGACTTCAGCTTCACCGACT
 TCCTGGAACACCTGTTGCGGCATGAAGCGGGGTGTGCCAGCAGCGCAGCCGCGAAGTGTGACGCGGATGGCT
 TGCTTCCCGGGCATCAAGACCCTGGAGGACTATGACTTCAGCTTCAACCCCGGCGTGCCCAAGGCACTGGTGCA
 GAGCTGGGCAGTCTGGCGTTTGTGCAACGGGCCGAGAACGTGGTGTGATCGGACCCTCTGGCATCGGCAAGAC
 CCACCTCGCCATCGCCTTGGGTTACAAGGCCGCGCAAGCCGGGGTCAAGACACGTTTCATCACGGCAGCCGACCT
 GATGCTGCAACTGAGCACGGCGCAGCGACAAGGGCGGCTGAAGGAATACTTCAACCGCGCCATCCTCGGTCCACG
 GCTGCTGGTGTGATGATGAGATCGGCTACCTGCTTTTCGGACGCGAGGAAGCGAACCTGTTCTTTTCAGGTGGTGGC
 GAAGCGCTATGAGAAAGGGGCGATGATCCTGACCTCGAACCTGCCGTTTCAGCCAGTGGGCCGACGCGTTTGGCGG
 CGATACCACCCTGACAGCCGCGATGCTGGATCGGCTGCTGCACCATGCCATATCCTGACCCTGAGCGGCGAAAG
 CTACCGCTTGAAGGACAAGAGGAAGGCGGGAGTGGTCAGGAAAAATTCAAACCCGAATGATCCAGGTGGGTGAG
 TATTACTTTGGTGATTACAGGGGTAAAGTGGGTGAGTTTTCAGTTGGTGTGACACCGGCGTACCCTCGGTGCTATCT
 TCGCGCCCAATAGTCGGGGCTTGGCCAGGACTTCTGAGGCCGTCGTAACGTGGATGCCGAGGTACAGGCGAG
 GTGGCCGACCCATGAACGCCGACCTGATTGTTTTTCAATAGCGCTGGACGTTGTGGTGGCAGGGACTTACCAACC
 CGATGTGTGCCATCCGGGGCAGTTACAGCCGTTACAGCCTCTGGAGAGGGAGCGGCTTGGCGCTCGGTGATAAT
 CCCAGCTGTAGCGCCTGATTACATCCGGCCGCTACACCTAGCTCCACCTTCAAACAAGGAATATCGTTGATGTCA
 CTGTATCGCCGCTAGTTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGGCCGCTGGCTGGCTTTTCTGCCACCGCGTACCAACC
 TCGTTCGCGGAACCATTCGCTAAACTCGAACAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGTGTGTACGCGATGGATACCGGCTC
 AGGCGCAA

15. Bibliografía

Alba J, Ishii Y, Thomson K, Moland ES, Yamaguchi K. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 4760-2.

Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2723-2725.

Beirao EM, Furtado JJ, Girardello R, Ferreira Filho H, Gales AC. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15: 69-73.

Bennett JW, Herrera ML, Lewis JSn, Wickes BW, Jorgensen JH. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas putida* coinfection in a liver transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 292-294.

Borer A, Saidel-Odes L, Riesenberk K et al. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009; 30: 972-976.

Bradford PA, Bratu S, Urban C et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 55-60.

Bratu S, Tolaney P, Karumudi U et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56: 128-32.

Bratu S, Landman D, Haag R et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med.* 2005; 165: 1430-5.

Bratu S, Mooty M, Nichani S et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 3018-20.

Brolund A, Sundqvist M, Kahlmeter G, Grape M. Molecular characterisation of trimethoprim resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a two year intervention on trimethoprim use. PLoS One. 2010; 5: e9233.

Bulik CC, Fautleroy KA, Jenkins SG et al. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. J Clin Microbiol. 2010; 48: 2402-2406.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39: 1211-1233.

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54:969-976.

Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52: 2014-2018.

Calfee D, Jenkins SG. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. Infect Control Hosp Epidemiol. 2008; 29: 966-968.

Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the UK, 2003–2011. <http://www.hpa.org.uk/HPR/archives/2011/news241.htm> (accessed Oct 28, 2012).

Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55: 1274-1278.

Centers for Disease Control and Prevention. Healthcare-associated infections. Tracking CRE. <http://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/TrackingCRE.html> (consultado Dic, 2013).

Cohen NR, Lobritz MA, Collins JJ. Microbial persistence and the road to drug resistance. Cell Host Microbe. 2013; 13: 632-642.

Correa A, Del Campo R, Perenguez M et al. High genetic diversity of clinical KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Colombia. 53rd ICCAC. 2013;C2-1101

Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P et al. Emergence of bla KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. J Antimicrob Chemother. 2010; 6: 1608-1614.

Cuzon G, Naas T, Demachy MC, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece.

Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52: 796-797.

Cuzon G, Naas T, Villegas MV, Correa A, Quinn JP, Nordmann P. Wide dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing beta-lactamase blaKPC-2 gene in Colombia. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55: 5350-5353.

Daikos GL, Petrikos P, Psychogiou M et al. Prospective Observational Study of the Impact of VIM-1 Metallo-beta-Lactamase on the Outcome of Patients with *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections. Antimicrob Agents and Chemother. 2009; 53: 1868-73.

Davies TA, Marie Queenan A, Morrow BJ et al. Longitudinal survey of carbapenem resistance and resistance mechanisms in Enterobacteriaceae and non-fermenters from the USA in 2007-09. J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 2298-2307

Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. J Clin Microbiol. 2005; 43: 4178-4182.

Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. J Clin Microbiol. 2008; 46: 4083-4086.

Domenech-Sanchez A, Hernandez-Alles S, Martinez-Martinez L, Benedi VJ, Alberti S. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. J Bacteriol. 1999; 181: 2726-2732.

Dortet L, Radu I, Gautier V, Blot F, Chachaty E, Arlet G. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. J Antimicrob Chemother. 2008; 61: 455-457.

Elemam A, Rahimian J, Mandell W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature. Clin Infect Dis. 2009; 49: 271-4.

Endimiani A, Paterson DL. Optimizing therapy for infections caused by enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases. Semin Respir Crit Care Med. 2007; 28: 646-655.

Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S et al. Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. J Clin Microbiol. 2010; 48: 4417-4425.

European Center for Disease Prevention and Control. EARS-Net database. <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARSNet/database/Pages/database.aspx> (consultada Dic, 2013).

Fisher MA, Stamper PD, Hujer KM et al. Performance of the Phoenix bacterial identification system compared with disc diffusion methods for identifying extended-spectrum beta-lactamase, AmpC and KPC producers. J Med Microbiol. 2009; 58: 774-

778.

Fontana C, Favaro M, Sarmati L et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. BMC Res Notes. 2010;3:40.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 73: 354-360.

Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V et al. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). J Antimicrob Chemother. 2011; 66: 1510-1513.

Giakoupi P, Maltezou H, Polemis M, Pappa O, Saroglou G, Vatopoulos A. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. Euro Surveill. 2009;14(21)

Giani T, D'Andrea MM, Pecile P et al. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. J Clin Microbiol. 2009; 47: 3793-3794.

Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol Infect. 2011; 17: 552-556.

Goldfarb D, Harvey SB, Jessamine K, Jessamine P, Toye B, Desjardins M. Detection of plasmid-mediated KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canada: evidence of intrahospital transmission. J Clin Microbiol. 2009; 47:1920-1922.

González-Salvatierra R, Guzmán-Blanco M. Conferencia Panamericana de Resistencia Antimicrobiana en la Américas. Rev Panam Infectol. 1999;3:S1-5.

Gomez SA, Pasteran FG, Faccione D et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. Clin Microbiol Infect. 2011; 17: 1520-1524.

Guzman-Blanco M, Labarca JA, Villegas MV, Gotuzzo E. Extended spectrum beta-lactamase producers among nosocomial Enterobacteriaceae in Latin America. Braz J Infect Dis. 2014: S1413-8670

Hernández-Gómez C BVM, Motoa G, Correa A, Maya JJ, de la Cadena E, et al. Evolución de la resistencia antimicrobiana en bacilos Gram negativos en unidades de cuidado intensivo en Colombia. Biomédica. In press 2014.

Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant

Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother. 2010; 65: 233-238.

Hrabak J, Studentova V, Walkova R et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2012; 50: 2441-2443.

Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 3203-3206.

Jolley KA, Chan MS, Maiden MC. mlstDbNet - distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. BMC Bioinformatics. 2004; 5: 86-94.

Jones CH, Tuckman M, Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum-beta-lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 465-475.

Jones RN, Guzman-Blanco M, Gales AC et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). Braz J Infect Dis. 2013; 17: 672-81.

Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53: 3365-3370.

Ko KS, Lee JY, Baek JY et al. Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. J Med Microbiol. 2010; 59:822-828.

Kumarasamy K, Kalyanasundaram A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India. J Antimicrob Chemother 2012; 67:243-244.

Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 3026-3029.

Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Goren MG, Ofek I, Navon-Venezia S. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54: 3002-3006.

Livermore DM, Hope R, Brick G, Lillie M, Reynolds R. Non-susceptibility trends among *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermentative Gram-negative bacteria from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. J Antimicrob Chemother. 2008; 62 Suppl 2:ii55-63.

Livermore DM. Fourteen years in resistance. Int J Antimicrob Agents. 2012; 39: 283-294.

Lizaso D, Aguilera C. Epidemiología y factores de riesgo de mortalidad de las bacteriemias intrahospitalarias por bacilos gramnegativos. *Rev Chilena Infectol.* 2008; 25: 368-373.

Lledo W, Hernandez M, Lopez E et al. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities. *MMWR.* 2009; 58: 256-260.

Lopez JA, Correa A, Navon-Venezia S et al. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 52-56.

Mammina C, Bonura C, Di Bernardo F et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro Surveill.* 2012; 17(33).

Mataseje LF, Bryce E, Roscoe D et al. Carbapenem-resistant Gram-negative bacilli in Canada 2009-10: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program (CNISP). *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 1359-1367.

Mazzariol A, Lo Cascio G, Ballarini P et al. Rapid molecular technique analysis of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in an Italian surgery unit. *J Chemother.* 2012; 24: 93-96.

Menozzi MG, Eigner U, Covan S et al. Two-center collaborative evaluation of performance of the BD phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4085-4094.

Microbiología ReSPGd. Manual de procedimientos para la determinación de susceptibilidad antibiótica en patógenos de importancia hospitalaria. 2012 (consultado en septiembre de 2013).

Mojica MF, Correa A, Vargas DA et al. Molecular correlates of the spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Colombia. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 40: 277-279.

Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 333-334.

Morris D, Boyle F, Morris C et al. Inter-hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 carbapenemase in Ireland. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 2367-2372.

Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13: 785-

796.

Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 4423-4424.

Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the beta-lactamase blaKPC Gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 1257-63.

Nadkarni AS, Schliep T, Khan L, Zeana CB. Cluster of bloodstream infections caused by KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Manhattan. *Am J Infect Control.* 2009; 37: 121-126.

Nastro M, Carranza N, Aprigliano F et al. Emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Microbiological and epidemiological characterization of the isolates producing and non-producing KPC-type carbapenemase. *Rev Argent Microbiol.* 2013; 45: 185-190.

Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 818-820.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17: 1791-1798.

Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 432-438.

OPS. Diseminación de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* en Latinoamérica. 2010.

Oteo J, Saez D, Bautista V et al. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 6344-6347.

Pacheco R, Osorio L, Correa AM, MV. V. Prevalencia de bacterias Gram negativas portadoras del gen blaKPC en hospitales de Colombia. *Biomédica.* In press 2014.

Pallecchi L, Lucchetti C, Bartoloni A et al. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1179-1184.

Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 4943-4960.

Pasteran F, Lucero C, Soloaga R, Rapoport M, Corso A. Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-carbapenemase producers among species of Enterobacteriaceae?. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 697-701.

Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 1178-1180.

Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1631-1639.

Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008; 29: 1099-1106.

Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 265-268.

Petrosillo N, Giannella M, Antonelli M et al. Colistin-glycopeptide combination in critically ill patients with Gram negative infection: the clinical experience. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013

Picao RC, Cardoso JP, Campana EH et al. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas spp.* and Enterobacteriaceae in sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 76: 80-85.

Pillai DR, Melano R, Rawte P et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15: 827-829.

Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E, Cleary T, Munoz-Price LS. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 3072.

Poirel L, Barbosa-Vasconcelos A, Simoes RR, Da Costa PM, Liu W, Nordmann P. Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 1662-1663.

Potron A, Poirel L, Verdavaine D, Nordmann P. Importation of KPC-2-producing *Escherichia coli* from India. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:242-243.

Polsfuss S, Bloemberg GV, Giger J, Meyer V, Hombach M. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI screening parameters for the detection of extended-spectrum beta-lactamase production in clinical Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 159-166.

Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 1319-1321.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20: 440-58.

Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 307-312.

Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol.* 2013; 62: 1721-1727.

Ribot EM, Fair MA, Gautom R et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella, spp* and *Shigella sp.* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 2006; 3: 59-67.

Richter SN, Frasson I, Franchin E et al. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathog.* 2012; 4: 7.

Rodriguez E, Bautista A, Barrero L. A first report of the emergence of *Salmonella* Typhimurium with carbapenemase (KPC-2) in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013

Roses Periago Mirta. La resistencia a los antimicrobianos: un factor de riesgo para las enfermedades infecciosas. *Rev Panam Salud Publica.* 2011; 30: 507-508.

Ruiz-Garbajosa P, Curiao T, Tato M et al. Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 2487-2492.

Saavedra SY, Duarte C, González MN, ME. R. Caracterización de aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* productores de carbapenemasas aislados en siete departamentos de Colombia. *Biomédica.* In press 2014.

Saavedra SY, Alvarez CA, Cuervo SI, Olarte N, Escobar JA, Leal AL, et al. Dissemination of a clone KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitals, Bogota, Colombia. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16: S361.

Saavedra SY, Alvarez CA, Saavedra C, Cuervo SI, Escobar JA, Ovalle MV, et al. Diseminación de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productores de KPC en hospitales de Colombia. VII Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas. *Infectio.* 2010; 14 (S1): 79.

Salmond GW, M. Antibiotic resistance: adaptive evolution. *The Lancet.* 2008; 372, 1:S97 S97 - S103.

Sambrook J, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Molecular cloning: a laboratory manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989

Samra Z, Ofir O, Lishtzinsky Y, Madar-Shapiro L, Bishara J. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 30: 525-529.

Schwaber MJ, Carmeli Y. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a potential threat. *JAMA*. 2008; 300: 2911-2913.

Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 1028-1033.

Schwaber MJ, Lev B, Israeli A et al. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis*. 2011; 52: 848-855.

Shen P, Wei Z, Jiang Y et al. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53: 4333-4338.

Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2007. *Am J Infect Control*. 2007;35:165.

Sisto A, D'Ancona F, Meledandri M et al. Carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* from Micronet network hospitals, Italy, 2009 to 2012. *Euro Surveill*. 2012;17(33).

Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 51: 711-4.

Spellberg B, Guidos R, Gilbert D et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2008; 46:155-64.

Srinivasan A, Patel JB. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing organisms: an ounce of prevention really is worth a pound of cure. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008; 29:1107-9.

Suh JY, Son JS, Chung DR, Peck KR, Ko KS, Song JH. Nonclonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 560-562.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 2233-2239.

Thomson KS. Extended-Spectrum-beta-Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:1019-25.

Thomson KS, Robledo IE, Vazquez GJ, Moland ES. KPC screening by updated BD Phoenix and Vitek 2 automated systems. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 3386-3387.

Toth A, Damjanova I, Puskas E et al. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29: 765-769.

Tsakris A, Kristo I, Poulou A et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 362-367.

Vading M, Samuelson O, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 668-674.

Villalobos Rodriguez AP, Diaz Ortega MH, Barrero Garzon LI et al. Trends of bacterial resistance phenotypes in high-complexity public and private hospitals in Colombia. *Rev Panam Salud Publica.* 2011; 30: 627-633.

Villalobos AP BLI, Rivera SM, Ovalle MV, Valera D. Vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud, resistencia bacteriana y consumo de antibióticos en hospitales de alta complejidad, Colombia, 2011. *Biomédica.* In press 2014.

Villegas MV, Lolans K, Correa A et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 2880-2882.

Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:1553-1555.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18: 306-25.

Wayne PA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Information Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009;M100 S-20.

Wayne PA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Information Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012;M100 S-23.

Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 763-765.

Weisenberg SA, Morgan DJ, Espinal-Witter R, Larone DH. Clinical outcomes of patients with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* after treatment with imipenem or meropenem. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 64: 233-235.

White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45: 2658-2661.

Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden MK. Emergence and rapid regional spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis.* 2011; 53: 532-540.

Woodford N, Tierno Jr PM, Young K et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 4793-9.

Woodford N, Dallow JW, Hill RL et al. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29: 456-459.

Woodford N, Eastaway AT, Ford M et al. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 2999-3002.

Woodford N, Zhang J, Warner M et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62:1261-1264.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 1151-1161.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2008; 52:809.

Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK et al. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 3881-3889.

Zarkotou O, Pournaras S, Voulgari E et al. Risk factors and outcomes associated with acquisition of colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: a matched case-control study. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 2271-2274.

Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17: 1798-1803.

Zhang X, Lu X, Zong Z. Enterobacteriaceae producing the KPC-2 carbapenemase from hospital sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 73: 204-206.