



Comportamiento clínico - microbiológico y dinámicas moleculares en infecciones por clones de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos portadores del gen *bla_{KPC}* en el período post-endémico en pacientes atendidos en una institución de salud de cuarto nivel en Bogotá, período 2014-2016.

Esta tesis hace parte del proyecto Colciencias con código
130877758007

Erika Paola Vergara Vela

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina - Departamento de Medicina Interna
Bogotá, Colombia
2020

Comportamiento clínico - microbiológico y dinámicas moleculares en infecciones por clones de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos portadores del gen *bla_{KPC}* en el período post-endémico en pacientes atendidos en una institución de salud de cuarto nivel en Bogotá, período 2014-2016.

Esta tesis hace parte del proyecto Colciencias con código
130877758007

Erika Paola Vergara Vela

Estudiante postgrado de Infectología
Universidad Nacional de Colombia

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar por el título de:

Especialista en Infectología

Director

Jorge Alberto Cortes Luna MD
Internista-Infectólogo
Director Departamento de Medicina Interna
Universidad Nacional de Colombia

Co-directores

Aura Lucia Leal Castro MD, MSc.
Médica especialista en microbiología
Master en control de infecciones
Líder Grupo de Investigación en Enfermedades Infecciosas-Colciencias
Universidad Nacional de Colombia

Javier Antonio Escobar Pérez MSc, PHD.

Coordinador Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana
Universidad El Bosque

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina - Departamento de Medicina Interna
Bogotá, Colombia
2020

Agradecimientos

Primero a Dios y a mis padres Leonardo y Eulalia por su apoyo incondicional; a mi esposo Christian y a mi Hijo Santiago quienes además de su acompañamiento paciente, son mi motor de vida y principal motivación para escalar tanto en el ámbito profesional como en el personal; a mis hermanas Diana y Liliana porque además de ser mis confidentes, son ejemplo de una vida exitosa y feliz. Agradezco a todo el grupo de docentes del programa de Infectología, Dra. Sonia Cuervo, Dr. Carlos Saavedra, Dr. Jorge Cortes y Dr. Carlos Álvarez, porque además de ser excelentes profesionales a los que admiro profundamente son unos seres humanos ejemplares y me han ratificado la importancia del equilibrio entre lo personal y lo profesional. Agradezco a la Dra. Aura Lucía Leal por su acompañamiento constante en este proceso, sin ella este trabajo no hubiera sido posible; agradezco a Javier Escobar y su genial grupo de investigación en genética molecular bacteriana de la Universidad El Bosque, quienes me abrieron las puertas para trabajar en este proyecto y con quienes he compartido momentos muy agradables. Finalmente, le agradezco a mi compañero y amigo Juan Sebastián de quién he aprendido la constancia y disciplina y he recibido apoyo constante en estos 2 años de aprendizaje.

Erika Paola Vergara Vela



Laboratorio de genética molecular bacteriana



Fundación
Santa Fe de Bogotá

Departamento de patología Fundación Santa Fe de Bogotá.
Enfermedades complejas



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Grupo de investigación en enfermedades infecciosas

Agradecimiento a Dra Diana Palacio de Hospital Universitario Fundación Santafé de Bogotá

RESUMEN

Introducción: *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos está implicada en procesos infecciosos principalmente en pacientes inmunosuprimidos y en eventos por atención en salud. La producción de enzimas que hidrolizan estos antibióticos es el principal mecanismo de resistencia, siendo KPC la de mayor distribución mundial y el clon CC 258 el más frecuentemente reportado. Recientemente se han informado otros clones; no se conocen comportamientos clínicos diferenciales por tipo de clado y tampoco el comportamiento en eventos procedentes de un mismo individuo.

Métodos: Estudio tipo serie de casos. En 3 años se tomaron aislamientos con *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos con el gen *bla*_{KPC} (Kp-KPC) en pacientes adultos de una institución de tercer nivel de Bogotá; se incluyeron todos los eventos de un mismo paciente. Se analizaron características clínicas de los individuos y moleculares en los aislamientos con identificación de tipo de KPC y otras Betalactamasas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), relación clonal por electroforesis de campo pulsado (PFGE) y tipo de ST. Se realizó secuenciación genómica en 4 de los clones más frecuentes identificados en el período de estudio.

Resultados: Se analizaron 143 eventos (aislamientos por Kp-KPC) de 69 pacientes quienes tenían alta comorbilidad. KPC 2 se encontró con más frecuencia; se documentó co- expresión con otras betalactamasas como CTX-M (27%) y TEM (37%), no se detectó OXA-48, VIM ni NDM. Se identificaron 46 pulsotipos, los más frecuentes el 4 (correspondiente con ST 258), 19 (ST 485) y 37 (ST111) en el 22%, 6% y 5,5% respectivamente. El pulsotipo 4 se presentó con mayor frecuencia en personas mayores y se asoció a mayor resistencia a ciprofloxacina, amikacina y gentamicina. Se documentó multiclonalidad y cambios genómicos generados tanto a nivel cromosomal bacteriano como mediados por elementos genéticos móviles en eventos procedentes de un mismo paciente.

Conclusiones: Existe circulación de múltiples clones de Kp-KPC en una misma institución y en eventos procedentes de un paciente; el ST 258 continúa siendo el más reportado y se asocia a resistencia a otros grupos antibióticos.

Palabras claves: *Klebsiella pneumoniae*, carbapenemasa, KPC, Resistencia antibiótica

ABSTRACT

Introduction: *K. pneumoniae* resistant to carbapenems, is implicated in infectious processes primarily in immunosuppressed patients and in events for health care. The enzyme production that hydrolyzes these antibiotics is the main resistance mechanism, KPC being the one with the largest world distribution and clone CC 258 the one reported most frequently. Recently, other clones have been reported; there is no knowledge of differential clinical behaviors by clade type or the behavior of preceding events of a same individual.

Methodology: Case series study. In 3 years there were preventive isolations with *K. pneumoniae* resistant to carbapenems with the *bla*_{KPC} (Kp-KPC) gen in adult patients in a third level institution in Bogota; all events of a same patient were included. The clinical characteristics of the individuals were analyzed as well as the molecular characteristics in the isolation with identification of KPC type and other Betalactamases on chain reaction (PCR), clonal relation for electrophoresis of pulsed field (PFGE), and ST type. A genome sequence was performed in 4 of the most frequent clones identified in the research period.

Results: 143 events (isolations for Kp-KPC) out of 69 patients who had high comorbidity. KPC 2 was encountered with a higher frequency; co-expression was documented with other betalactamases like CTX-M (27%) and TEM (37%), OXA-48, VIM and NDM were not detected. 46 pulse types were identified, the most frequent ones were el 4 (correspondent to ST 258), 19 (ST 485) y 37 (ST111) in the 22%, 6% and 5,5% respectively. The 4th pulse type was presented with a higher frequency in third age people and was associated to higher resistance to ciprofloxacin, amikacin, and gentamicin. The multiclinality was documented and genome changes both at a bacterial chromosomal and at the ones mediated by mobile genetic elements in preceding events in the same patient.

Conclusions: there is circulation of multiple clones of Kp-KPC in a same institution and in preceding events in patients; the ST 258 continues to be the one reported the most and it is associated to resistance to other antibiotic groups.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, KPC, antibiotic resistance

Contenido

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
LISTA DE TABLAS.....	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
2.1 Pregunta de investigación	15
3. ESTADO DEL ARTE.....	16
3.1 Generalidades <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
3.2 Factores de riesgo para infección por <i>K. pneumoniae</i> con resistencia a carbapenémicos.....	17
3.3 Mecanismos de resistencia en <i>K. pneumoniae</i> y otros Gram negativos	17
3.4 Epidemiología de las infecciones por <i>K. pneumoniae</i> con resistencia a carbapenémicos portadoras del gen <i>bla</i> _{KPC}	20
3.5 Rol del Tansposón 4401 a en la diseminación de Kp-KPC.....	21
3.6 Determinación fenotípica de carbapenemasas en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
3.6 Determinación molecular de carbapenemasas en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
4. OBJETIVOS.....	28
4.1 Objetivo General	28
4.2 Objetivos Específicos	28
5. METODOLOGIA	29
5.3 Proceso de recolección de muestras y datos	29
5.4 Plan de análisis estadístico.....	38
5.5 Presupuesto	39
5.6 Cronograma de actividades.....	39
6. CONSIDERACIONES ÉTICAS	40
7. RESULTADOS.....	41
7.1 Objetivo 1. Descripción de características clínicas de pacientes y sus eventos de infección o colonización por <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenémicos portadores del gen <i>bla</i> _{KPC}	41
7.2 Objetivo 2. Establecer las características microbiológicas y moleculares de los aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> portadores del gen <i>bla</i> _{KPC}	46
7.3 Objetivo 3 . Determinar la relación genética de los aislamientos por medio de PFGE (Electroforesis campo pulsado) y MLST	46
7.4 Objetivo 4 y 5. Establecer la secuencia del genoma de los principales linajes genéticos identificados en la población de aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> seleccionados y describir cambios genómicos de algunos aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes a carbapenémicos procedentes de un mismo paciente tras el uso de diferentes tipos de antibióticos indicados para este tipo de infecciones.	53
8. DISCUSIÓN.....	65
9. CONCLUSIONES	70
10. ANEXOS.....	71
ANEXO 1. Algoritmo de trabajo.....	71
ANEXO 2. Avals comité de ética.....	72
11. REFERENCIAS	75

LISTA DE TABLAS

Tabla3-1 . Clasificación de β-lactamasas y carbapenemasas	20
Tabla 5-3-1. Operacionalización de variables	31
Tabla 5-2. Presupuesto y financiación	39
Tabla 5-3- Cronograma.....	39
Tabla 7-1. Características de la población con eventos por Kp-KPC.....	43
Tabla 7-2 . Frecuencia de aislamientos por paciente	44
Tabla 7-3. Caracterización de los eventos por Kp-KPC.....	45
Tabla 7-4 . Distribución clonal <i>K. pneumoniae bla_{KPC}</i> 2014-106.....	47
Tabla 7-5. Características clínicas de pacientes agrupadas por pulsotipo	51
Tabla 7-6. Resistencia antibiótica de los eventos y presencia de otras β - lactamasas agrupada por pulsotipo	51
Tabla 7-7. Multiclonalidad en eventos de un mismo paciente	52
Tabla 7-8. Análisis general de los ensamblajes de los genomas de los tres aislamientos identificados en el paciente 8	57
Tabla 7-9. Determinación y localización de los genes de resistencia de 3 aislamientos representativos identificados en el paciente 8.....	58

LISTA DE FIGURAS

Gráfico 7-1. Algoritmo para inclusión de pacientes y eventos por Kp-KPC.	42
Gráfico 7-2. Distribución por paciente de los clones de <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>bla_{KPC}</i> 2014-2016	48
Gráfico 7-3. Diversidad clonal en eventos por Kp-KPC 2014-2016	50
Gráfico 7- 4. Diversidad clonal en pacientes y comportamiento de clones en los 3 años	53
Gráfica 7-5. Análisis genético, perfil de susceptibilidad y resistoma de los eventos con clones de Kp-KPC comparados con la terapia antibiótica administrada durante la estancia hospitalaria de la paciente 8 en 2015.	55
Gráfica7-6. Análisis genómico comparativo en eventos Kp-KPC de paciente 8	59
Gráfica 7-7 . Comparación de los plásmidos determinados en los aislamientos 33Kpn9 y 33Kpn12 con los plásmidos IncFII(K) previamente reportados.....	61
Gráfica 7-8.Inserción del Tn4401b del plásmido IncI2(Δ) en el cromosoma del aislamiento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> 33Kpn22.....	62
Gráfica 7-9. Diversidad clonal en eventos del paciente 10.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

EDTA Acido etilendiaminotetraacetico

MIC Concentración mínima inhibitoria

INS Instituto Nacional de Salud

KP-KPC *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos mediado por gen KPC

LGMB Laboratorio de genética molecular bacteriana

MLST Multilocus sequence typing

PFGE Electroforesis en campo pulsado

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

BLEE Beta-lactamasa de espectro extendido

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Klebsiella pneumoniae es responsable de infecciones del tracto urinario, absceso hepático y neumonía en pacientes inmunocompetentes y principalmente en inmunocomprometidos, tanto en la comunidad como en escenarios de atención en salud. La resistencia de *K. pneumoniae* a los antibióticos ha sido creciente, con diseminación de clones resistentes a carbapenémicos a nivel mundial, lo que ha generado incremento en costos por estancia hospitalaria y mortalidad [1, 2], haciendo que este tipo de infecciones sean un importante problema de salud pública; adicionalmente se cuenta con pocas opciones terapéuticas y con fármacos de bajo umbral de toxicidad.

La resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* se presenta por varios mecanismos, el más relevante de tipo enzimático mediado por diferentes enzimas que hidrolizan esta familia de antibióticos (Serina carbapenemasas del grupo A y D y metalobetalactamasas del grupo B de Ambler); la que se reporta con más frecuencia en América es de tipo KPC (carbapenemasa de serina clase A) y pueden encontrarse tanto en elementos genéticos móviles como a nivel cromosomal [1] [3]. Los primeros informes de estas enzimas datan de 1996 [4], pero han tenido una amplia diseminación mundial desde la primera década del siglo XXI. En USA, el sistema de vigilancia nacional SENTRY reportó entre 2007 a 2009 datos de 42 centros médicos informando la presencia de *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos y gen *bla_{KPC}* (Kp-KPC) del 5.5% [5]; el año siguiente el reporte aumento a 14% identificando variantes del gen KPC tipo 2 y 3 [6]; la incidencia anual en este país para el 2012 - 2013 de enterobacterias resistentes a carbapenémicos y portadoras del gen *bla_{KPC}* (principalmente *K. pneumoniae*) fue 2.93 por 100.000 habitantes [7]. Otros países endémicos para estas enzimas son Grecia e Israel [1]. En Latinoamérica Villegas y colaboradores informaron frecuencia de carbapenemasas en enterobacterias (en 255 pacientes con bacteriemias) de 21% y de ellas un 83% correspondían a KPC (la más frecuente KPC 3) siendo *K. pneumoniae* su principal representante [8]. En Colombia, el primer reporte de KPC se realizó en Medellín en 2005 en 2 pacientes

sin antecedentes de viaje o exposición a áreas endémicas [9]. Luego en 2008 en la misma ciudad se presentó un brote por *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, cuyo caso índice fue un paciente proveniente de Israel para el programa de trasplante hepático; mediante estudios de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción y secuenciación, se confirmó la presencia de *K. pneumoniae bla_{KPC-3}*, genéticamente similar a la cepa de Israel involucrada en múltiples brotes nosocomiales en ese país [10]. El grupo CIDEIM reportó entre los años 2009 a 2012 (en pacientes de Unidades de Cuidado intensivo) *K. pneumoniae* con *bla_{KPC}* en 68% de los aislamientos [11] considerándose entonces Colombia un país endémico para KP-KPC y el complejo clonal 258 (CC258 y sus variantes ST11 y ST340) los reportados con mayor frecuencia [12]. El último informe del Instituto Nacional de Salud sobre resistencia antimicrobiana informó una frecuencia del 15% de *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos [13].

A la fecha se han descrito más de 115 variantes clonales, además hay a cambios en la epidemiología molecular con reportes de otros ST tanto en Colombia [14] como en otros países [15]. El reporte del Instituto Nacional de Salud del 2018 informó una frecuencia del 15% de *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos [13]; esta frecuencia en aumento genera prioridades para la vigilancia continua de este tipo de microorganismos y se convierte en eje fundamental para los procesos de control de infecciones.

A pesar que en la literatura se encuentran múltiples publicaciones caracterizando molecularmente *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos y series de pacientes con infecciones por estos microorganismos, a la fecha no se conoce muy bien la dinámica de los clones en individuos infectados, especialmente en aquellos con colonización crónica, así como los patrones de resistencia y coresistencia que pueden irse modificando en el tiempo. Tampoco es claro como cambian los diversos clados en diferentes pacientes atendidos en una institución. El objetivo de este estudio es describir las características de la población de pacientes con aislamientos de Kp-KPC, su comportamiento clínico, así como la variabilidad genética clonal de los aislamientos en una institución de alta complejidad de Bogotá.

2. JUSTIFICACIÓN

El advenimiento de la resistencia bacteriana y las infecciones derivadas de estas, constituyen un problema de salud pública en todo el mundo principalmente por las pocas opciones terapéuticas. La Organización Mundial de la Salud emitió en el año 2014 el primer reporte global de resistencia antimicrobiana informando altas tasas en las principales bacterias causantes de infecciones hospitalarias y de comunidad en el mundo, tales como *K. pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii* [16]. Cada año en los Estados Unidos, cerca de dos millones de personas adquieren infecciones graves por bacterias que son resistentes a uno o más de los antibióticos que fueron diseñados para su manejo. El CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) en su reporte del 2013 clasificó las infecciones causadas por *Enterobacterias* con resistencia a carbapenémicos como una amenaza urgente para el sistema de salud, con aproximadamente 600 muertes atribuibles a microorganismos resistentes [17]. Desde el punto de vista clínico, se ha reportado aumento de mortalidad entre 30 – 70% en pacientes con neumonías o bacteriemias por *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos cuando se comparan este tipo de infecciones con la contraparte sensible [18] [19]. Así mismo hay aumento en costos por tratamiento y mayor estancia hospitalaria [1].

Colombia es un país endémico para enterobacterias con resistencia a carbapenémicos y de ellas la más frecuente *K. pneumoniae* productora de enzimas carbapenemasas de tipo serina KPC. La epidemiología molecular ha permitido conocer los clones de mayor diseminación en el país siendo el CC ST 258 el más frecuentemente reportado y la enzima KPC 3 la de mayor prevalencia. [20]. Este clon se ha relacionado con mayor probabilidad de resistencia antibiótica a otros fármacos, aunque sin clara evidencia de mayor virulencia. En los últimos años se han reportado en diferentes países la aparición de otros complejos clonales como el ST 307 y el ST 147, y en Colombia un informe del 2016 de 5 hospitales de Medellín muestra como los clones diferentes al ST 258 circulan con mayor frecuencia. [14]. No hay evidencia directa de que uno u otro clon se asocie a peores desenlaces, pero es muy llamativo la persistencia en el tiempo de solo

unos pocos y que a pesar de las políticas de control de infecciones instauradas en las instituciones la diseminación parece no detenerse e incluso tiende al aumento lo que sugiere mecanismos diferentes para adaptación y supervivencia de estos microorganismos .

Por otra parte, los fenómenos de colonización por *K. pneumoniae* se han documentado con frecuencia en pacientes que han tenido contacto con el medio hospitalario y han recibido antibióticos de amplio espectro. las tasas de colonización nasofaríngea por *K. pneumoniae* se han informado entre 3 a 15% y son mayores en adultos que en niños ; la colonización en el tracto gastrointestinal se ha reportado en 35% pero esta frecuencia se incrementa hasta el 77% si se ha recibido antibiótico previo [21]. La persistencia en la colonización por cepas de Kp-KPC puede prolongarse incluso más de un año[22] y se desconocen cuales son los mecanismos perpetuadores de este fenómeno y el impacto que tiene el uso de antibióticos

Es por esto que la integración de estudios clínicos y de biología molecular se convierte en una necesidad y herramienta para la generación de nuevo conocimiento en desenlaces clínicos diferenciales, impacto en selección de terapia antibiótica óptima y creación de estrategias que permiten mayor control para estas infecciones .

2.1 Pregunta de investigación

¿Cómo es el comportamiento clínico – microbiológico y las dinámicas moleculares de las infecciones por *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos portadores del gen *bla*_{KPC} en el período postendémico en pacientes atendidos en una institución de salud de cuarto nivel en Bogotá período 2014-2016

3. ESTADO DEL ARTE

3.1 Generalidades *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es un patógeno oportunista, común en infecciones adquiridas en la comunidad y hospitalarias. Es un bacilo Gram negativo no esporulado, que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. El género *Klebsiella* está conformado según la clasificación de Cowan por 5 especies: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. aerogenes*, *K. edwardsii* y *K. rhinoscleromatis*. Este microorganismo puede colonizar e invadir diferentes tejidos ya que posee varios factores de virulencia como el antígeno capsular K que le permite evadir la fagocitosis bacteriana y la activación del complemento, el lipopolisacárido (LPS) que se encuentra presente en la membrana externa e impide la activación del completo, sideroforos que facilitan la captación de hierro del medio ambiente y finalmente, el pili factor importante para la adherencia celular [23].

Klebsiella pneumoniae es la especie que tiene mayor relevancia clínica; es agente causal de infección del tracto urinario, absceso hepático y neumonía en pacientes sin factores de riesgo pero con mayor frecuencia estas infecciones están en pacientes inmunosuprimidos[23]. La mayoría de infecciones por *K. pneumoniae* se adquieren en el hospital, y además de las infecciones ya mencionadas, en este escenario se presenta también como causal de infección en heridas quirúrgicas, en dispositivos médicos intravasculares u otros invasivos, en infección biliar, en peritonitis y en meningitis. Es la segunda aislada, luego de *E. coli*, en bacteriemias con foco urinario [24]. Los pacientes con neumonía por *K. pneumoniae* generalmente son adultos con antecedente de alcoholismo, y gracias a sus factores de virulencia tiene la capacidad de generar abscesos pulmonares. Todas las cepas de son resistentes a la ampicilina gracias a un gen cromosómico que codifica una B lactamos específicas penicilina [25]. Este microorganismo tiene alta capacidad de adquirir resistencia a través de plásmidos (Ver mecanismo de resistencia) .

En Colombia los resultados del programa de vigilancia por laboratorio de

resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud (IAS) 2016 informan que fue la principal enterobacteria enviada para análisis de los eventos y que el principal mecanismo de resistencia era de tipo enzimático por la producción de KPC [26]; en el informe del 2018 *K. pneumoniae* fue el primer agente causal de neumonía asociada a la ventilación mecánica, el primero en infecciones asociadas a dispositivos intravasculares y el segundo ([27] luego de *E. coli*) en infecciones urinarias asociadas a sonda vesical. *K. pneumoniae* también se encuentra como organismo colonizante a nivel nasofaríngeo y gastrointestinal [21].

3.2 Factores de riesgo para infección por *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos

Los factores de riesgo para infección y colonización por CPE (Enterobacterias productoras de carbapenemasas) se han descrito e incluyen: uso previo de antibiótico, exposición aguda y crónica a los ambientes hospitalarios, comorbilidades crónicas y uso de dispositivos médicos invasivos[28]: la alteración en el microbioma también ha tomado importancia[29]. En el estudio CRAKLE el promedio de edad de los pacientes con infecciones por *K. pneumoniae* productora de KPC fue de 70 años (rango de 58 a 71), predominio en mujeres (60%). Las comorbilidades más frecuentes fueron Diabetes mellitus 56% , falla cardíaca 57%, 26% insuficiencia renal y el índice de comorbilidad de Charlson fue 4 (rango 2 a 6) [30]. En los reportes de vigilancia del CDC se informa con frecuencia el uso de dispositivos médicos : 75% catéter urinario, 43% catéter venoso central y 39% dispositivos para alimentación enteral . Los estados de inmunodepresión y principalmente en pacientes con trasplante de órganos sólidos también se reportan como factores de riesgo [31].

3.3 Mecanismos de resistencia en *K. pneumoniae* y otros Gram negativos .

El principal mecanismo de resistencia en *K. pneumoniae* es la producción de enzimas con capacidad de hidrólisis de B-lactámicos [32]. Las de mayor impacto clínico y epidemiológico son la B-lactamasas de espectro extendido (BLEE) , las de tipo AmpC y las carbapenemasas.

Las β -lactamasas de espectro extendido tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas de primera y segunda generación, oximinocefalosporinas (cefotaxime, ceftriaxona y ceftazidime) y monobactámicos (aztreonam); son sensibles a los inhibidos de betalactamasas (ácido clavulánico, sulbactam tazobactam y avibactam). y en ellas se incluyen las derivadas de TEM, SHV y las CTX-M (cefotaximasas). La expansión de BLEE, especialmente de tipo CTX-M se favorece por la transferencia horizontal de plásmidos. En Colombia además se presenta expresión simultánea de enzimas SHV y TEM y la BLEE SHV-5 es la más frecuente [33] [34] .

Las cefotaximasas; hidrolizan la cefotaxima y la ceftriaxona con mayor eficiencia que la ceftazidima; estas enzimas han reemplazado a TEM y SHV en diversas áreas geográficas, incluido en Latinoamérica, se encuentran en la comunidad y hospitalariamente. Los primeros reportes para Colombia datan del año 2002 en *K. pneumoniae*; posteriormente se describió CTX-M-12 en cepas de *K. pneumoniae* hospitalaria, así como en otras enterobacterias como *E. coli* y *K. oxytoca*. Se han reportado otras cefotaximasas como CTX M 12 a, CTX-M-15 , CTX-M-60 [33]

Las enzimas tipo AmpC, presentes cromosomalmente en algunas enterobacterias y Gram negativos no fermentadores, tienen la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación, cefamicinas , diferenciándose de las BLEE en que no son inhibidas por los inhibidores (Sulbactam y clavulánico) ; en *K. pneumoniae* se encuentran más frecuentemente en plásmidos [32].

Las betalactamasas tipo carbapenemasas se han identificado principalmente en Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*, pueden estar codificadas en forma cromosómica o por genes asociados con elementos genéticos móviles como traspones, plásmidos e integrones; estas enzimas tienen mayor espectro de hidrólisis frente a gran parte de los betalactámicos, incluidos los carbapenémicos. Se clasifican desde el punto de vista molecular (Clasificación de Ambler) o desde el punto de vista funcional (Clasificación de Busc-Jacoby – Medeiros) [35]. Las β lactamasas que confieren resistencia a los carbapenémicos

en enterobacterias, pertenecen a 3 de estos grupos: clase A, B y D. Las enzimas clase A incluye la familia de carbapenemasas por *K. pneumoniae* (KPC) y otras menos frecuentes como las no metalo carbapenemasas tipo A (NMC-A) y SME que se encuentran en *E. cloacae* y *S. marcesens* respectivamente. Las enzimas clase B incluyen las metalobetalactamasas como la New Delhi metalobetalactamasa NDM, la familia IMP y la metalobetalactamasa codificada por el integrón Verona VIM; requieren Zinc para la hidrólisis, tienen actividad para todos los B lactámicos, excepto los monobactámicos. En la clase D se incluyen las carbapenemasas tipo oxacilinasas OXA 48 e inducen hidrólisis leve a penicilinas y carbapenémicos pero no cefalosporinas y en consecuencia son más difíciles de detectar y se han llamado de patrón fantasma [36]:

La primera descripción de IMP se realizó en Japón en un aislamiento de *Pseudomonas*; en Latinoamérica se describió en *K. pneumoniae* multiresistente [37]

Las enzimas VIM se han reportado en Colombia en *Pseudomonas aeruginosa*, la variante VIM 24 en *Klebsiella pneumoniae* en un gen localizado en un integrón y transportado en un plásmido; también se tiene reporte de NDM en *K. pneumoniae* y otras enterobacterias, así como de enzimas OXA, principalmente OXA 48 [33].

La carbapenemasa más frecuente reportada en *K. pneumoniae* es de tipo serina correspondiente a KPC.

Tabla3-1 . Clasificación de β -lactamasas y carbapenemasas

Clasificación de Ambler	Busch-Jacoby-Medeiros	Nombre de la familia	Atributos	Encontradas en plásmidos	Encontradas en cromosomas
A	2f	Serine carbapenemasas	Debilmente inhibidas por tazobactam y clavulonato.	KPC;GES	SME-1; IMI;NMC-a;SHV
			Inhibidas por ácido borónico, susceptibles aztreonam	NDM-1;VIM	NDM-1
B	3a;3b;3c	Metalo B-lactamasas	Inhibidas por EDTA . No inhibidas por clavulonato, tazobactam o ácido borónico	IMP;SIM, SMP	NDM-1
C	1e	B-lactamasas d espectro extendido AmpC	Susceptibles a cloxacilina . Inhibidas por ácido borónico	CMY-10	PDC
D	2df	Oxacilinasas que hidrolizan carbapenémicos	No inhibidas por otros componentes que inhiben otras carbapenemasas	OXA 48	

Adaptado de Revised Ambler Classification [38]

Otros mecanismos para la resistencia a carbapenémicos en enterobacterias es la pérdida de porinas (proteínas transmembrana en la capa externa de gram negativos) y la expresión de bombas de eflujo (proteínas con capacidad de expuslar sustancias desde el interior hasta el exterior de la célula) [32]. La hiperexpresión de enzimas tipo AmpC asociado a la presencia de porinas o bombas de flujo también se manifiestan con la expresión fenotípica de resistencia a carbapenémicos.

La resistencia a otras familias antibióticas esta mediada por alteración en porinas, bombas de flujo para antibióticos seleccionados y alteración enzimática (enzimas modificadoras de la molécula, como en aminoglucósidos). Las cepas de *K. pneumoniae* que son resistentes a carbapenémicos tienen mayor probabilidad de resistencia a otras familias antibióticas.

3.4 Epidemiología de las infecciones por *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos portadoras del gen *bla*_{KPC}

Los primeros informes de las enzimas carbapenemasas datan de 1996 [4], pero han tenido una amplia diseminación mundial desde la primera década del siglo XXI. En USA, el sistema de vigilancia nacional SENTRY reportó entre 2007 a 2009 datos de 42 centros médicos informando la presencia de *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos y gen *bla*_{KPC} (KP-KPC) del 5.5% [5]; el año

siguiente el reporte aumento a 14% identificando variantes del gen KPC tipo 2 y 3 [6]; la incidencia anual en este país para el 2012 -2013 de enterobacterias resistentes a carbapenémicos y portadoras del gen *bla_{KPC}* (principalmente *K. pneumoniae*) fue 2.93 por 100.000 habitantes [7]. Otros países endémicos para estas enzimas son Grecia e Israel [1]. En Latinoamérica Villegas et al informaron frecuencia de carbapenemasas en enterobacterias (en 255 pacientes con bacteriemias) de 21% y de ellas un 83% correspondían a KPC (la más frecuente KPC 3) siendo *K. pneumoniae* su principal representante [8]. En Colombia, el primer reporte de KPC se realizó en Medellín en 2005 en 2 pacientes sin antecedentes de viaje o exposición a áreas endémicas [9]. Luego en 2008 en la misma ciudad se presentó un brote por *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, cuyo caso índice fue un paciente proveniente de Israel para el programa de trasplante hepático; mediante estudios de polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción y secuenciación, se confirmó la presencia de *K. pneumoniae bla_{KPC-3}*, genéticamente similar a la cepa de Israel involucrada en múltiples brotes nosocomiales en ese país [10]. El grupo CIDEIM reportó entre los años 2009 a 2012 (en pacientes de Unidades de Cuidado intensivo) *K. pneumoniae* con *bla_{KPC}* en 68% de los aislamientos [11] considerándose entonces Colombia un país endémico para KP-KPC y el complejo clonal 258 (CC258 y sus variantes ST11 y ST340) los reportados con mayor frecuencia [12]. KPC-3 se ha reportado con mayor frecuencia en Colombia.

A la fecha se han descrito más de 115 variantes clonales, además hay a cambios en la epidemiología molecular con reportes de otros ST tanto en Colombia [14] como en otros países [15].

3.5 Rol del Tansposón 4401 a en la diseminación de Kp-KPC

La transmisión de genes KPC (*bla_{KPC}*) esta mediado por diferentes mecanismos moleculares, el principal es vía Transposón 4401^a el cual tiene la capacidad de pasar a plásmidos (que sufren procesos frecuentes de conjugación); ellos se han difundido en diferentes enterobacterias, siendo *K. pneumoniae* ST 258 la especie predominante lo que sugiere una ventaja selectiva y mejor fitness [39].

El elemento genético móvil que contiene el gen *bla* KPC es el transposon Tn4401; este tiene 10 Kb en longitud y contiene además del gen *bla* KPC, tiene el gen transposasa Tn3(tapa), el Tn3 resolvasa gen (tnpR) y 2 secuencias de inserción ISKpn6 e ISKpn7 [40]. Esta estructura tiene alta capacidad de movilización entre especies de enterobacterias, y además del gen *bla*KPC alberga otros como los genes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos *aac6* y *aadA1*, genes de otras B-lactamasas, *bla* OXA-9 y *bla* TEM1.

Se han descrito isoformas que se han asociado con varios plásmidos de *bla* KPC. Este también se ha descrito en otros elementos genéticos aislados en China, Argentina y otras regiones

En relación a los plásmidos, el gen *bla* KPC se ha descrito en de enterobacterias, y también en *P.aeuriginosa* a nivel cromosomal. A la fecha se han secuenciado más de 40 plásmidos, la mayoría de; estos contienen varios genes que confieren resistencia a otros antibióticos como aminoglucosidos, quinolonas, trimetropim y tetraciclinas, lo que indica co-selección de cepas por presión antimicrobiana para aparición de multiresistencia.

3.6 Determinación fenotípica de carbapenemasas en *Klebisella pneumoniae*

El CLSI (Clinical and laboratory Standards Institute) disminuyó los puntos de corte para carbapenémicos en enterobacterias: Meropenem e Imipenem MICs menor o igual a 1 y para Ertapenem menor o igual a 0.05. La primera identificación para resistencia se hace a través de los sistemas automatizados (Vitek, MicroScan, Phoenix); una vez identificadas las muestras se realiza la identificación fenotípica para lo que se cuenta con 3 técnicas [41]:

1. Ensayos en medio de cultivo con medición de la resistencia en presencia de antibiótico (Test de Hodge modificado y el método de inactivación de carbapenémico modificado)
2. Métodos de hidrólisis, se detecta el producto de hidrólisis catalizado por enzimas carbapenemasas (Ej Carba NP) y
3. Inmunoensayo en flujo lateral, en el que se detectan las enzimas a través con anticuerpos

El test de Hodge modificado MHT es el mas conocido para la detección de

carbapenemasas, en este se incluye en el agar un disco impregnado de meropenem o ertapenem, se inocula una *E. coli* susceptible a carbapenémico, la cepa problema y un control. El test se fundamenta en la capacidad de disminuir la concentración local del antibiótico, favoreciendo el crecimiento de la cepa que es susceptible generando una apariencia de trébol en el agar. El test tiene buena sensibilidad para la detección de carbapenemasas tipo KPC (entre 93 a 98% para enterobacterias) pero baja sensibilidad para las Metalo Beta lactamasas MBL. Se pueden tener falsos positivos con cepas productoras de BLEE o cefalosporinas AmpC en conjunto con mutaciones de porinas, por lo tanto su especificidad es limitada reportada en 91% . Este es un test económico y de fácil realización, sin embargo consume tiempo ya que requiere de 24 horas adicionales para el crecimiento de la bacteria luego que se ha tenido la identificación. En el 2018 este test se retiró del CLSI como prueba Dx.

El CarbaNP detecta carbapenemasas al medir la hidrólisis in vitro del imipenem, al exponerlo a extractos bacterianos, con cambios en la coloración en 2 horas. La hidrólisis de imipenem resulta en la producción de un derivado carboxílico , que disminuye el pH , y este produce cambio de coloración de rojo a amarillo. Su sensibilidad para la detección de carbapenemasas esta reportada entre 73 a 100% , sin embargo la sensibilidad para la detección de otro tipo de enzimas como OXA-48 es menor; en la actualidad existen variantes del mismo. El Carba NP también se ha utilizado para la evaluación de carbapenemasas en no fermentadores, incluyendo enzimas de clase A, B y D . La sensibilidad y especificidad para *P. aeuriginosa* fue de 98% mientras que la sensibilidad para *A. baumannii* fue del 19% y especificidad del 100%; el CarbaNP modificado podría incrementar la sensibilidad en este microorganismo, pero aún es subóptimo.

El método de inactivación del Carbapenémico se fundamenta en el uso de un disco de 10 ug de meropenem incubado durante 2 horas en agua con 10 ul de una cepa productora de carbapenemasa , que genera la hidrólisis del medicamento. El disco se retira y se traslada a un agar Mueller Hinton en el que se encuentra una cepa de *E. coli* susceptible. Luego de la incubación, la ausencia de la zona de

inhibición del microorganismo indica la presencia de carbapenemasa. La sensibilidad del MIC está entre 91 a 94% y la especificidad entre 99 a 100%; esta técnica no permite diferenciar entre enzimas serio de metal B lactamasas, por lo que se han sugerido modificaciones al ensayo, con la adición de EDTA

Los ensayos de flujo lateral son métodos fundamentados en la identificación de Anticuerpos para la identificación de carbapenemasas; se han introducido recientemente al mercado y permiten la detección de algunas carbapenemasas de importancia epidemiológica; también se han desarrollado para detectar NDM, IMP, OXA 48, KPC e incluso detección simultánea de KPC, NDM y OXA 48; los resultados se tienen en 15 minutos. En análisis retrospectivos y prospectivos la sensibilidad de uno de los prototipos de esta técnica llamado NG-Test Carba5 fue del 100% y la especificidad se informo entre 95 a 100%

El MALDI-TOF MS es una plataforma muy conocida, fundamentada en la proteómica y usada para la identificación a nivel de género y especie de microorganismos [42]. En la actualidad se ha propuesto como una técnica para la identificación rápida de carbapenemasas a través de 2 aproximaciones :1. Hidrólisis, en la que se detectara los productos de degradación del antibiótico, posterior a la incubación de extractos de proteínas bacterianas + el sustrato carbapenémico, y 2, con la identificación del pico de una proteína asociada a plásmidos de liberación de carbapenemasas. A la fecha no se tienen protocolos establecidos para los métodos de hidrólisis y se está trabajando la técnica para la identificación de proteínas asociadas a plásmidos.

3.6 Determinación molecular de carbapenemasas en *Klebisella pneumoniae*

La caracterización molecular de los mecanismos de resistencia es parte integral de la investigación clínica; en algunos casos las pruebas fenotípicas son dispendiosas y consumen tiempo generando demoras en la toma de decisiones terapéuticas; las pruebas moleculares son utilizadas para la búsqueda de genes o mutaciones puntuales que permiten identificación temprana de resistencias antibióticas, esto además de favorecer el inicio de una terapia adecuada, permite realizar estudios epidemiológicos de brotes y vigilar los perfiles de resistencia

locales .

Los métodos moleculares de tipificación utilizan como diana DNA cromosómico y DNA de elementos genéticos móviles de transmisión horizontal (plásmidos, transposones integrones y secuencias de inserción). Se clasifican en 3 grupos: 1. basadas en perfiles de restricción del DNA (plasmídico o cromosómica), 2. amplificación por PCR (reacción en cadena de polimerasa), 3. secuenciación parcial de genes y 4. secuenciación genómica completa.

En los estudios de perfiles de DNA plasmídico se realiza extracción de plásmidos que posteriormente son separados por electroforesis en un gel de agarosa y se analizan con el patrón de número de bandas plasmídicas así como sus tamaños.

En el estudio de perfiles de restricción de DNA cromosómico se utiliza una enzima de restricción que genera un número variable de fragmentos de diferente tamaño , los cuales se separan por electroforesis , generando 2 patrones: enzimas de corte frecuente o poco frecuente

La PCR es una técnica que se desarrollo en 1980s por Kari Mullis [43] ; en esta técnica se logra la amplificación de una secuencia blanco de DNA , utilizando un primer de PCR reverso , una enzima llamada DNA polimerasa , en presencia de deoxiribonucleotidos (dntps). La PCR convencional incluye 3 pasos fundamentales: 1. De-naturalización de la cadena doble de DNA a 95°C 2. Unión de los primers a la hebra de DNA a 50 a 60°C y 3. Extensión del DNA a 72°C . Esta técnica permite la detección de genes presentes en la bacteria y depende de que la secuencia de DNA de interés este disponible o se tenga parte del gen a partir del cual se puedan diseñar los primers . El producto amplificado del gen se puede visualizar en un gel de agarosa , en el que se tiñe el DNA con bromuro de etidio o a través de quelantes fluorescentes. El proceso de una PCR convencional tarda entre 4 a 5 horas. En la actualidad se cuenta con técnicas avanzadas, en la que se incluye la PCR en tiempo real (RT-PCR), la amplificación isotérmica y la amplificación de recombinasa -polimerasa. La diferencia entre una PCR convencional y una RT-PCR es que en la última el DNA de interés es monitorizado

en tiempo real y a través de técnica con fluorescencia permite la cuantificación del mismo; en RT-PCR no se requiere de un gel de agarosa para imprimir el producto. La diferencia entre una PCR convencional con la PCR con amplificación isotérmica, como su nombre lo indica, radica en que el proceso se realiza a una misma temperatura .

En las PCR múltiples diferentes fragmentos de DNA se amplifican simultáneamente y se pueden realizar con técnica convencional o por RT-PCR; con esta técnica diferentes genes de resistencia se pueden detectar simultáneamente utilizando diferentes primers. Actualmente el set de PCR multiplex permite la detección de diferentes carbapenemasas (IMP, VIM, GIM, SIM NMD, OXA, KPC) y en el 2011 se amplió la detección de esta PCR a cefalosporinasas tipo AmpC plasmídicas, (ACC, ACT, DHA, CMY, FOX, LAT, MIR y MOX) metalobetalactamasas (IMI, SME y NMC-A) y OXA (23, 24, 51, 58 y 143) .

La PCR convencional permite detectar la presencia o ausencia de un gen particular pero es menos útil para la detección de mutaciones puntuales.

Otra técnica molecular empleada son los microarreglos; estos permiten evaluar la diversidad genómica al detectar presencia o ausencia de genes del organismo de interés comparado con un microorganismo referencia.

Los MLST (multilocus sequencing typing): En esta técnica se secuencia parcialmente 6 o 7 genes metabólicos muy conservados (housekeeping genes) que tienen baja presión selectiva . Los miembros asignados a un mismo grupo muestran por lo menos 6 de 7 alelos idénticos. Esta técnica tiene la ventaja de ofrecer resultados objetivos, reproducibles , permite almacenamiento en formato electrónico , crear bases de datos , lo que favorece comparar perfiles o secuencias entre aislamientos de diferentes áreas geográficas Esta técnica permite el estudio epidemiológico global a largo plazo , en los que se quiere conocer la estructura poblacional de un microorganismo.

En la secuenciación genómica completa, se pueden detectar determinantes

genéticas (genes y mutaciones) relacionados con resistencia antibiótica . La gran ventaja con esta técnica es que tiene la habilidad de cubrir varios blancos simultáneos y variantes genéticas ; gracias a esta tecnología se obtienen nuevas secuencias que permiten alimentar bases de datos genómicas ; permite además reanálisis con cada secuencia identificada. La tecnología Sanger fue la usada inicialmente ; hoy se cuenta con otras como Illumina y Ion Torrent machines, denominadas como secuenciación de segunda o próxima generación.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Describir las características clínicas y microbiológicas de las infecciones por *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos portadores del gen bla_{KPC} y las dinámicas moleculares de las infecciones a partir de muestras procedentes de un mismo paciente.

4.2 Objetivos Específicos

- Describir las características clínicas y demográficas de los pacientes con aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos portadores del gen bla_{KPC} .
- Describir las características microbiológicas y moleculares de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos portadores del gen bla_{KPC} .
- Determinar la relación genética de los aislamientos de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos por medio de PFGE y MLST.
- Establecer la secuencia del genoma de los principales linajes genéticos identificados en la población de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* seleccionados.
- Describir cambios genómicos de algunos aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos portadores del gen bla_{KPC} procedentes de un mismo paciente tras el uso de diferentes tipos de antibióticos indicados para este tipo de infecciones.

5. METODOLOGIA

5.1. Tipo de estudio

Estudio descriptivo observacional retrospectiva tipo serie de casos en una institución de cuarto nivel de Bogotá.

5.2 Universo y población

Criterios de inclusión

Se incluyeron aislamientos de *K. Pneumoniae* resistentes a carbapenémicos portadores del gen *bla*_{KPC} (confirmadas por biología molecular) provenientes de pacientes adultos y del banco institucional de cepas de la Fundación Santafé en el período de enero 2014 a diciembre 2016.

Criterios de exclusión

Los aislamientos de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos con mecanismos de resistencia diferente al *bla*_{KPC} fueron excluidos; de igual forma se excluyeron aquellos aislamientos de pacientes en quienes no se tuvieran los registros clínicos completos

5.3 Proceso de recolección de muestras y datos

El proceso inició con la identificación de muestras clínicas con aislamientos de *K. pneumoniae* (confirmadas por equipo MALDI-TOF institucional) que expresaran resistencia a carbapenémicos (sistema Vitek 2 ®, acorde a puntos de corte CLSI para los años en vigencia) a las que además se les realizó confirmación fenotípica (test de Hodge modificado, ácido borónico o prueba Carba NP, este último disponible desde el 2016). Estos aislamientos se conservaron a -70°C, y se enviaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional, en donde se realizó recuperación, confirmación de viabilidad y pureza de las muestras; posteriormente se enviaron al laboratorio de genética molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque (LGMB). En LGMB se realizó la confirmación molecular para género, especie y gen *bla*_{KPC}.

Para el cumplimiento de cada uno de los objetivos se realizaron las siguientes actividades:

1. Descripción de características clínicas de pacientes y sus eventos de infección o colonización por *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos portadores del gen *bla_{KPC}*
 - a. Los registros clínicos de pacientes con aislamientos Kp-KPC fueron revisados para su caracterización; se incluyeron variables demográficas, antecedentes médicos, tipo de hospitalización (causa médica o quirúrgica), grado de comorbilidad (Índice de Charlson), diagnóstico clínico, uso de antibióticos en el último año, requerimiento de manejo en Unidad de cuidado intensivo, terapia antibiótica empleada para el tratamiento y mortalidad, con seguimiento hasta el alta hospitalaria. Se definió como un evento cada aislamiento clínico (que podría corresponder a infección o colonización) y en aquellos pacientes que presentaron más de 1 evento estos se analizaron por separado. Los eventos se clasificaron acorde a la fuente o procedencia, diagnóstico y significancia clínica.

Tabla 5-3-1. Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPOS DE VARIABLE	Nivel operativo
Fecha de ingreso	Fecha de ingreso a hospitalización	Cuantitativa	día/mes/año
Fecha de egreso	Fecha en que finaliza la hospitalización	Cuantitativa	día/mes/año
Fecha del evento microbiológico por Kp-KPC	Fecha de reporte anotada en Vitek	Cuantitativa	día/mes/año
Días de hospitalización	Diferencia entre el día de egreso e ingreso	Cuantitativa	días
Género	Sexo biológico	Nominal	Femenino/masculino
Edad	Edad del paciente en años al momento del primer evento	Cuantitativa de razón	Años
Procedencia del paciente en el momento del aislamiento (evento)	Lugar donde se encontraba el paciente en el momento del aislamiento	Nominal	Urgencias, hospitalización, UCI o consulta externa
Procedencia de la muestra	Localización anatómica del aislamiento microbiológico	Nominal	Orina, sangre, muestra respiratoria, liquido o tejido peritoneal, LCR, absceso, otros
Número de aislamientos	Número total de aislamientos por Kp-KPC del paciente en el período de 3 años	Cuantitativa Razón	Número de aislamientos
Tratamiento antibiótico previo en el último año	El paciente ha recibido cualquier esquema antibiótico en los 12 meses previos al ingreso	Nominal	Sí/No

Tabla 5-3-1 Continuación

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPOS DE VARIABLE	Nivel operativo
Tipo de antibiótico recibido	Se especificará para cada uno de los eventos tipo de terapia AB recibida (si la tuvo)	Nominal	Recibió: penicilinas/inhibidores, cefalosporinas de primera, segunda o tercera generación, cefalosporinas cuarta generación, carbapenémicos, polimixina, aminoglucósidos, quinolonas, tigeciclina
Cirugías previas : instrumentación	El paciente tuvo cualquier procedimiento quirúrgico o instrumentación como sondajes o biopsias durante el período de referencia	Nominal	Sí/No
Indicación de hospitalización por causa médica o quirúrgica	Hospitalización médica indica patología de manejo clínico no quirúrgico/ patología quirúrgica implica realización de procedimientos invasivos o mínimamente invasivos como causa primaria de la hospitalización	Nominal	Causa médica o causa quirúrgica
Otros aislamientos microbiológicos durante el período de observación	Se enumeraran otros tipos de microorganismos aislados en el paciente durante el período de referencia	Nominal	Mencionar el tipo de aislamiento
Indice de comorbilidad	Se medirá con la escala de Charlson. Sistema de evaluación de la esperanza de vida a los 10 años dependiente de edad y comorbilidades . A mayor puntuación menor probabilidad de supervivencia	Cuantitativa razón	0 a 33
Cirrosis	Resultado final de daño crónico hepático causada por una enfermedad prolongada (crónica) del hígado. Se presentan cambios morfológicos (hígado nodular en	Nominal	Sí/No
Diabetes Mellitus	Criterios Clasificatorios ADA: Glicemia en ayunas mayor a 126 mg/dl, glicemia en cualquier momento del día mayor a 200mg/dl, alteraciones en test de tolerancia oral a carbohidratos o niveles de Hb glicosilada mayores a 6.5%	Nominal	Sí/No

Tabla 5-3-1 Continuación

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPOS DE VARIABLE	Nivel operativo
EPOC	Enfermedad respiratoria caracterizada por una limitación al flujo aéreo asociada a una respuesta inflamatoria anormal y como disnea como manifestación clínica principal	Nominal	Sí/No
VIH	Infección producida por el virus de la inmunodeficiencia humana , en cualquiera de sus estadios, y definida por la presencia de 2 ELISAS reactivos para VIH1 o VIH 2 de diferente generación	Nominal	Sí/No
IRC	Pérdida progresiva, permanente o irreversible de la tasa de filtración glomerular estimado en la disminución del acaramiento de creatinina menor a 60 ml / min/1.73 mtdurante al menos 3 meses, y con cmabios bioquímicos o clínicos como hipercalcemia, anemia, hiperfosfatemia entre otros	Nominal	Sí/No
Inmunosupresión diferente a VIH	Alteración primaria o secundaria del sistema inmunológico que incrementa susceptibilidad a procesos infecciosos por defectos cuantitativos o cualitativos de tipo celular o humora. En este item se incluye inmunosupresión medicamentosa por terapias biológicas, inmunomoduladores y uso de corticoides	Nominal	Sí/No
Trasplante de órgano sólido	Se define como una hospitalización para realización de trasplante de algún órgano sólido (hígado, corazón, riñón, pulmon)	Nominal	Sí/No
Trasplante de progenitores hematopoyéticos	Se define como una hospitalización para realizar trasplante de progenitores por neoplasia u otras patologías	Nominal	Sí/No
Cáncer	Cualquier patología neoplásica maligna	Nominal	Sí/No
Usuario crónico de corticoide u otro tipo de inmunosupresión farmacológica	uso de más de 10 mg de prednisona o equivalente de forma crónica	Nominal	Sí/No

Tabla 5-3-1 **Continuación**

VARIABLE	DEFINICIÓN	TIPOS DE VARIABLE	Nivel operativo
Tuvo algún ingreso a UCI en la hospitalización	cualquier ingreso a UCI secundario a enfermedad severa	Nominal	Sí/No
Estado el egreso	Se define el último día de hospitalización como vivo o fallecido	Nominal	Vivo o fallecido
Evento clínicamente significativo	Cualquier aislamiento clínico en el que el paciente haya presentado criterios de infección por respuesta sistémica, disfunción orgánica o choque atribuido a sépsis, y en el que el médico tratante así lo haya considerado y haya iniciado terapia antibiótica dirigida. Lo que no se incluye en esta categoría se interpretará como colonización	Nominal	Sí/No
Tratamiento antibiótico indicado	Si se considero clínicamente significativo, indicar dosis, tipo y duración de antibiótico	Nominal	Carbapenémico/polimixina/tigeciclina/aminoglucósido/quinolona/aztreonam/otros
Terapia antibiótica combinada	En pacientes con aislamiento clínicamente significativos, sedo terapia con 2 o más antibióticos	Nominal	Sí/no. Especificar
Ingreso a UCI con el evento	Especificar si el paciente ingreso o no a UCI con el evento	Nominal	Sí/no
Severidad de le enfermedad al ingreso a UCI	Medido al ingreso con SOFA . Escala utilizada para medir la severidad del estado del paciente, incluye variables respiratorias, (PAFI o saturación), función hepática (bilirrubinas) hematológicas (plaquetas)	Cuantitativa razón	0-16
Severidad de le enfermedad al ingreso a UCI	Medido al ingreso con APACHE	Cuantitativa	0 a 22
Resistencia a otros grupos de antibióticos	Los eventos presentaron resistencia a aminoglucósidos y/o quinolonas y/o tigeciclina y/o colistina	Nominal	Sí/no
Pulsotipo identificado por PFGE	Clon identificado por PFGE	Descriptiva nominal	1-46
Evento con pulsotipo 4	El evento informado presenta pulsotipo 4 (ST 258)	Nominal	Sí/no

- b. Se compararon variables clínicas de los pacientes estratificadas por características moleculares de los aislamientos (Pulsotipo 4 Vs Pulsotipo no 4); se compararon los perfiles de sensibilidad antibiótica de los eventos a otros grupos de antimicrobianos usando las mismas categorías, así como la distribución diferencial de otras enzimas B-lactamasas (TEM y CTX-M) .
2. Establecer las características microbiológicas y moleculares de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadores del gen *bla_{KPC}*.

- a. Los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* se enviaron al Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana de la Universidad El Bosque y al grupo de investigación en enfermedades infecciosas de la Universidad Nacional de Colombia en medios de transporte AIMES con carbón activado (BD Culture Swab PlusTM Aimes, Becton Dickinson[®]), siguiendo las recomendaciones proporcionadas en el decreto 1609 de 2002 del Ministerio de transporte y diligenciando una ficha de envío. Las muestras se sembraron por agotamiento en medios nutritivos y selectivos (Mac Conkey para Gram negativos) y se incubaron a las condiciones adecuadas para cada microorganismo durante 24 horas.
- b. Se realizó extracción del DNA de cada aislamiento por el método de fenol/cloroformo y precipitación con etanol de acuerdo a las condiciones ya estandarizadas en el laboratorio de Genética Molecular Bacteriana. Se confirmó género y especie por medio de la amplificación del gen *khe*, y se evaluó la posible contaminación con otras especies mediante la amplificación de los genes *pehX* (*Klebsiella oxytoca*), *uidA* (*Escherichia coli*), *ehe* (*Enterobacter cloacae*), *wosA* (*Proteus mirabilis*) por PCR múltiple. Para la amplificación se usaron las siguientes condiciones estandarizadas en el Laboratorio de Genética Molecular Bacteriana: denaturación a 95°C por 10 minutos, seguido de 30 ciclos a 95°C por 15 segundos, 56°C por 60 segundos, 72°C por 60 segundos y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los tamaños de amplímero fueron: *pehX* (185pb), *khe* (243pb), *ehe* (322), *uidA* (388pb), *wosA* (494pb), los cuales fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con solución de bromuro de etidio 0,5 mg/ml y revelados con un analizador de geles Gel Doc XR+ System (Bio-Rad.). Las cepas usadas como control positivo fueron: *Klebsiella oxytoca* ATCC 43086, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 y *Proteus mirabilis* ATCC 43071.
- c. Se evaluaron los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} y *bla*_{OXA-48} (relacionados con la resistencia a

antibióticos B-lactámicos) , siguiendo las condiciones reportadas por *Monteiro y Col [44]* .

- d. La determinación de las variantes *bla_{KPC-2}* y *bla_{KPC-3}* se realizó mediante la restricción enzimática del amplímero de *bla_{KPC}* con la enzima *RsaI* por dos horas a 37°C, utilizando la mezcla de H₂O destilada desionizada estéril, 2µl de buffer RE a 10X, 5µg de BSA acetilado, 10µl del producto de PCR del gen *bla_{KPC}* y 5u de *RsaI*. Como control positivo de los genes de *bla_{KPC-2}* y *bla_{KPC-3}* se usaron las cepas de *K. pneumoniae* 24kpn33 y 16kpn4, respectivamente. Los productos esperados de la restricción para *bla_{KPC-2}* fueron 70pb y 740pb y para *bla_{KPC-3}* fueron 70pb, 120pb y 680pb; los amplímeros de *bla_{KPC-2}* fueron confirmados por secuenciación.
- e. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron con el sistema VITEK 2®

3. Determinar la relación genética de los aislamientos por medio de PFGE (Electroforesis campo pulsado) y MLST

La relación genética de los aislamientos se estableció mediante la digestión del DNA genómico con la enzima *XbaI* (New England Biolabs). Los fragmentos de DNA obtenidos fueron separados por PFGE, siguiendo el protocolo de *Schwartz y Col. [45]*. Los aislamientos con pulsotipos idénticos o con menos de dos bandas de diferencia fueron agrupados en clones. Adicionalmente, el tipo de secuencia (ST) fue determinado en aislamientos representativos de los clones de mayor circulación (diversidad intra-institución) y en clones aislados de un mismo paciente (diversidad intra-paciente) de acuerdo a las condiciones descritas por *Diancourt y Col. [46]*. . El resultado fue comparado con los alelos reportados para cada gen, los cuales se encontraron en la base de datos de MLST del Instituto Pasteur disponible en <https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>

4. Establecer la secuencia del genoma de los principales linajes genéticos identificados en la población de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* seleccionados.

Se seleccionaron 4 eventos con representación de los pulsotipos más frecuentes para secuenciación para lo cual se realizó un cultivo bacteriano en caldo LB suplementado con ceftazidima (CAZ) [16 µg/ml], con el fin de mantener la presión selectiva para bacterias que albergaban el gen de interés, y se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se realizó una dilución 1:100 en caldo LB suplementado con CAZ [16 µg/ml], que se incubó nuevamente en shaker a 37°C, 200 rpm hasta obtener una densidad óptica (OD) de 0,6 a 625 nm a partir del cual se extrajo el ADN total siguiendo el protocolo del kit comercial UltraClean® Microbial ADN Isolation Kit (QIAGEN N.V.). El ADN extraído fue verificado con un control de calidad cuantitativo y cualitativo; mediante la cuantificación de la concentración a 260nm y la revisión de las relaciones 260/280 y 260/230 en NanoDrop 2000c (BIORAD®) con el fin de descartar la presencia de proteínas y otros contaminantes; y la visualización de la integridad del ADN en una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0,6%. Para cada ADN bacteriano se realizó una librería SMRTbell™ de 20kb, siguiendo el protocolo de SMRTbell® Express Template Preparation Kit 2.0 (Illumina, Inc.) y para la obtención de las lecturas se utilizó la plataforma de PacBio RS II (Illumina, Inc.) con la química P6-C4 y una SMRT cell. Las lecturas obtenidas fueron ensambladas *de novo* usando el protocolo SMRT Analysis v2.3 y el programa HGAP en el SMRT portal. Los contigs obtenidos del ensamblajese compararon entre ellos mismo para buscar la presencia de extremos repetidos, sugestivos de estructuras circulares completas, a través de Artemis Comparison Tool (ACT) [47] y el análisis de dotplot con el programa GEPARD 1. Las secuencias de los contigs fueron evaluados haciendo un mapeo de las lecturas obtenidas, usando el programa BWA-MEM [48] , con el fin de observar el alineamiento de las lecturas a cada uno de los contigs e identificar si había zonas atípicas en el mapeo que pudieran corresponder a fallas durante el proceso del ensamblaje. Estos resultados se observaron sumados al archivo de anotación estructural en formatoGenBank resultado de la identificación de los marcos de lectura de los contigs en Prokka v1 [49].1Se observó que, en las zonas de los

extremos repetidos, algunos genes se encontraban truncados debido a la baja cobertura de las lecturas, por lo cual se hizo un proceso de circularización manual con el fin de remover una de las secuencias repetidas. En el proceso de circularización se conservó las regiones de cada extremo que presentaban mayor cobertura y marcos abiertos de lectura completos. Teniendo en cuenta que el punto de inicio de las secuencias es asignado aleatoriamente durante el ensamblaje, se cambió empleando el programa Circlator [50] y usando los genes *dnaA* (definido como punto de inicio del cromosoma bacteriano) y *repA* o *repB* (como punto de inicio de los plásmidos) en las secuencias que albergaban estos genes. Posteriormente, se identificó la presencia de los genes de resistencia a antibióticos mediante la herramienta de BLAST de la base de datos de ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) y CARD (<https://card.mcmaster.ca/>).

5. Describir cambios genómicos de algunos aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos procedentes de un mismo paciente tras el uso de diferentes tipos de antibióticos indicados para este tipo de infecciones
 - a. Se presentan en una línea de tiempo la caracterización fenotípica y molecular de 14 aislamientos procedentes de un mismo paciente en relación al tipo de antibiótico utilizado así como sus dosis acumuladas. Los eventos de este paciente fueron los analizados por secuenciación .

5.4 Plan de análisis estadístico

- a. Los datos se analizaron con el programa estadístico Excel (Microsoft, USA) y con SPSS Statistics versión 21(IBM). Las variables cuantitativas se presentaron como medianas y rangos , las variables categóricas se presentaron como frecuencias y porcentajes .Para establecer diferencias en variables cuantitativas entre los grupos se utilizó la prueba T de Student o el test Kruskal wallis acorde a su distribución y correlación. Las variables categóricas se compararon con el test χ^2 o test exacto de Fisher.

5.5 Presupuesto

Tabla 5-2. Presupuesto y financiación

Rubro	Financiado	Contrapartida en efectivo	Contrapartida en Especie	Valor Total
Equipos	\$39.000.000	\$3.800.000	\$33.014.200	\$75.814.200
Eventos académicos	\$14.100.000	\$9.400.000	0	\$23.500.000
Gastos de operación	\$19.013.750	\$3.500.000	0	\$22.513.750
Materiales e insumos	\$85.500.000	10.260.000	0	\$95.760.000
Personal científico	\$87.600.000	0	\$226.526.023	\$314.126.023
Publicaciones	\$2.320.000	0	0	\$2.320.000
Seguimiento y evaluación	\$8.719.162	0	0	\$8.719.162
Servicios técnicos	\$43.105.000	5.172.600	0	48.277.600
Total	\$299.357.912	\$32.132.600	\$259.540.223	\$591.030.735

Esta tesis hace parte del proyecto Colciencias con código 130877758007, de quien se recibió financiación.

5.6 Cronograma de actividades

Tabla 5-3- Cronograma

	Mes 2	Mes 4	Mes 6	Mes 8	Mes 10	Mes 12	Mes 14	Mes 16	Mes 18
Revisión del proyecto por asesores temáticos, entrega del proyecto y aprobación.	X								
Revisión de registro clínicos		X	X	X					
Procesamiento muestras microbiológicas		X	X	X	X	X			
Análisis estadístico de los datos						X	X		
Preparación del documento final								X	X
Preparación de artículo									X
Sustentación del trabajo									X

6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Teniendo en cuenta la resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, por la cual se establecen las “normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”, se consideró que los participantes no estuvieron expuestos a riesgos por tratarse de un estudio retrospectivo, en el que se analizaron muestras clínicas con aislamientos de *K. Pneumoniae* resistentes a carbapenémicos ; no se realizó ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los participantes y sólo se obtuvo información de su historia clínica. Por tratarse de un estudio retrospectivo no se requirió de consentimiento informado

Se mantuvo la confidencialidad de la información; a los aislamientos se les asignó un código que no tuvo conexión alguna con el nombre u otro dato que pudiese identificar al participante

Este estudio no generó ningún tipo de conflicto entre los investigadores y los médicos tratantes de los participantes. El propósito de la propuesta no fue de carácter comercial , solo fue investigativo y buscó el beneficio de la comunidad científica y de la población en general.

Por tratarse de un proyecto en el que se realizó manipulación de muestras con potencial patógeno se siguieron en todo momento y con rigurosidad las medidas de prevención de riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos, así como las recomendaciones de bioseguridad en el laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se contó con recurso humano calificado y entrenado técnicamente en prácticas de bioseguridad.

Este proyecto fue aprobado por el Comité Corporativo de Ética en Investigación de la Fundación Santa Fe de Bogotá y por el Comité de la Universidad El Bosque. Los resultados serán publicados en revistas de índole académica, preservando la exactitud de los mismos y haciendo referencia a datos globales .

7. RESULTADOS

7.1 Objetivo 1. Descripción de características clínicas de pacientes y sus eventos de infección o colonización por *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos portadores del gen *bla_{KPC}*

Durante el periodo de estudio, se analizaron 182 aislamientos (recuperados de 89 pacientes), previamente identificados como *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos por técnicas microbiológicas; 36 (19.8%) fueron recuperados en el año 2014, 73 (40.1%) en 2015 y 73 (40.1%) en 2016. Posterior a la confirmación molecular de género y especie 165 (90.7%) se confirmaron como *Klebsiella pneumoniae*, 8 (4.4%) como *Klebsiella oxytoca*, 7 (3.8%) como *Escherichia coli*, y en 2 (1.1%) no se logró establecer la especie. Los 17 (9.3%) aislamientos que no amplificaron la especie de interés fueron excluidos del estudio. De los 165 aislamientos confirmados molecularmente como *Klebsiella pneumoniae* se encontró el gen *bla_{KPC}* en 152 (92.1%). Estos 152 aislamientos fueron recuperados de 77 pacientes, de ellos en 8 (4.8%) no se obtuvieron los registros clínicos para análisis ; considerándolo lo anterior se incluyeron en el estudio 69 pacientes con 143 aislamientos de *K. pneumoniae* portadores del gen *bla_{KPC}*. Gráfico 1

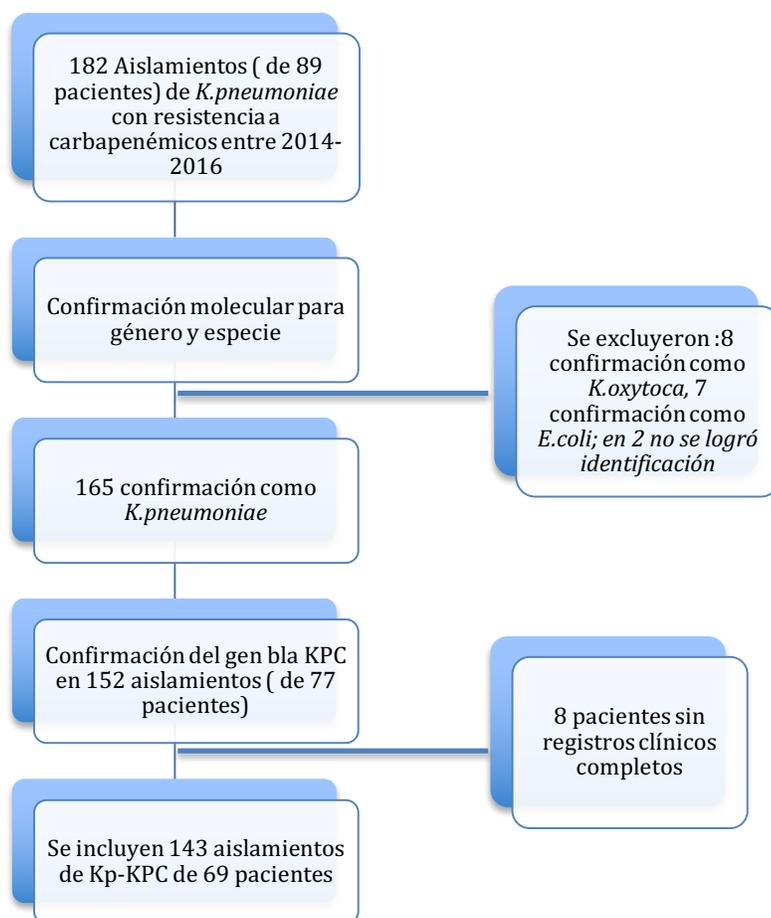


Gráfico 7-1. Algoritmo para inclusión de pacientes y eventos por Kp-KPC.

La proporción de hombres y mujeres fue similar con una mediana de edad de 56 años (rango intercuartílico de 14 a 94). En el grupo de edades entre 40 a 59 años se encontraron 24 pacientes (34,8%). La principal causa para hospitalización fue por indicación quirúrgica en 36 pacientes (52%), los procedimientos más frecuentes se realizaron en tracto gastrointestinal en 17 (24%) y trasplante hepático en 9(13%). La mediana del índice de Charlson fue 4 (rango 0-11). En orden de frecuencia las comorbilidades reportadas fueron : tener algún tipo de inmunosupresión (diferente a VIH, principalmente medicamentosa por uso de esteroides u otros fármacos) en 29 (42%), diabetes mellitus en 19 (27%), cirrosis en 19 (27%) y cáncer en 19(27%) pacientes. Ninguno tuvo diagnóstico de VIH . De los 19 pacientes con cáncer 15 tenían tumores de órganos sólidos y 4 de tipo hematológico. Tabla 7-1

Tabla 7-1. Características de la población con eventos por Kp-KPC

N=69			
VARIABLE	n	%	Mediana (Rango)
Género			
Masculino	35	50.7	
Femenino	34	49.2	
Edad			
Menor de 20 años	5	7.2	
Entre 20 y 39 años	9	13	
Entre 40 y 59 años	24	34.8	
Entre 60 y 79 años	20	29	
Mayor a 80 años	11	15.9	
Causa de Hospitalización			
Causa quirúrgica	36	52	
Cx Abdominal/ tracto gastrointestinal	17	24.6	
Trasplante hepático	9	13	
Neurocirugía	4	5.8	
Ortopedia	4	5.8	
Cx cabeza y cuello	2	2.9	
Causa médica	33	47.8	
Comorbilidades			
Inmunosupresión (no VIH)	29	42	
Cirrosis	19	27	
DM	19	27	
Cancer	19	27	
Organo sólido	15	21.7	
Hematológico	4	5.8	
Insuficiencia renal crónica	15	21	
EPOC	6	8.7	
Indice de Charlson			4 (0-11)
Antibiótico en el último año	66	95	
Ingreso a UCI	45	65	
APACHE			18 (5-26)
SOFA			6 (1-18)
Estancia hospitalaria			29 días (0-996)
Muerte	12	17	

La mediana de tiempo entre el ingreso a la institución y la aparición de algún aislamiento por Kp-KPC fue 8 días (rango -4 a 748); el rango negativo corresponde a 1 paciente en quien el evento se documentó 4 días previos al ingreso en orina y fue hospitalizado con diagnóstico de infección urinaria. En 66 pacientes (95%) se tenía antecedente de haber recibido por lo menos 1 esquema antibiótico en el último año siendo los más frecuentes penicilinas e inhibidores

(62%) , carbapenémicos (44%) y cefalosporinas de cuarta generación (18%). En 45 pacientes (65%) que tuvieron algún ingreso a Unidad de cuidado intensivo durante la hospitalización índice (mediana de ingresos 3), la mediana de APACHE II (Acute physiology and chronic Health evaluation II) fue 18 (rango 5 a 26) y de SOFA (Sequential organ failure assessment score) 6 (rango 1-18). Durante el período de estudio fallecieron 12 pacientes (17%), 3 de estas muertes fueron atribuibles a sepsis por Kp-KPC.

En el periodo de seguimiento se documentaron 143 eventos. La cantidad de eventos por paciente en diferentes momentos de la hospitalización fueron: 1 en 42 (60%), 2 en 14(20%) , 3 en 6(8.7%) y más de 4 en 7 (10%) pacientes. Tabla 7-2; la mediana de estancia hospitalaria para la cohorte general fue 29 días (rango 0 a 996) y fue mayor para los pacientes que tuvieron más de un evento (56 días) comparado con pacientes con solo un evento (25 días) (p menor 0.01).

Tabla 7-2 . Frecuencia de aislamientos por paciente

Numero de aislamientos	n (pacientes)	%
1	42	60.9
2	14	20.3
3	6	8.7
4	1	1.4
5	2	2.9
6	1	1.4
7	1	1.4
13	1	1.4
15	1	1.4

De la totalidad de los eventos 88 (61%) fueron clínicamente significativos , los restantes correspondieron a algún tipo de colonización. La fuente principal de los aislamientos fue orina en 66 muestras (46%), seguida de líquido o tejido peritoneal en 20 (14%) , muestras respiratorias 17 (11.9%) y hemocultivos 15 (10,5%). El principal diagnóstico clínico fue Infección de vías urinarias en 42 casos (29%), seguido de bacteriuria asintomática en 23 (16%), bacteriemia en 17 (11%) y peritonitis en 14 (9.8%). De los eventos en los que se administró antibiótico en 29 (32%) de los casos se administró terapia combinada de

carbapenémico + polimixina, 19(21%) monoterapia con carbapenémico, 10(11%) triple terapia con carbapenémico + aminoglucósido + fosfomicina; los demás esquemas antibióticos se presentan en la Tabla 7-3 .

Tabla 7-3. Caracterización de los eventos por Kp-KPC

Eventos N= 143	n	%
Fuente de la muestra		
Orina	66	46,2
Líquido peritoneal u otra fuente abdominal	20	14
Muestra respiratoria	17	11,9
Sangre	15	10,5
Abscesos	5	3,5
LCR	2	1,4
Otros	18	12,6
Diagnóstico clínico de los eventos		
Clínicamente significativos	88	60,8
Infección de vías urinarias	42	29,4
Bacteriemias	17	11,9
Foco gastrointestinal/abdominal/biliar	8	5,1
Asociada a cateter	6	4,9
Neutropenia febril	1	0,69
Bacteriemia primaria	1	0,69
Bacteriemia foco urinario	1	0,69
Peritonitis	14	9,8
Infección sitio operatorio órgano espacio	7	4,9
Neumonía	2	1,4
Colangitis	2	1,4
Osteomielitis	2	1,4
Ventriculitis	2	1,4
No significativos	55	38,4
Bacteriuria asintomática	23	16,1
Colonización respiratoria	12	8,4
Otra colonización	20	13,3
Tratamiento eventos significativos		
Carbapenemico+polimixina	29	32
Carbapenemico	19	21
Carbapenemico+aminoglucósido+fosfomicina	10	11
Carbapenemico+fosfomicina	6	6,8
Carbapenemico+tigeciclina	4	4,5
Carbapenemico+aminoglucosido	3	3,4
Carbapenemico+tigeciclina+ciprofloxacina	3	3,4
Carbapenemico+tigeciclina+polimixina	3	3,4
Fosfomicina	2	2,2
Polimixina	2	2,2
Aminoglucósido+fosfomicina	2	2,2
Otros	5	5,6

7.2 Objetivo 2. Establecer las características microbiológicas y moleculares de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadores del gen *bla*_{KPC}.

En los perfiles de sensibilidad antibiótica, además de la resistencia a carbapenémicos se encontró resistencia a ciprofloxacina en 90 eventos (62%), amikacina en 53(36%) y gentamicina en 7 (4%); se tuvo información de perfil de sensibilidad para colistina en 85 eventos y para tigeciclina en 60; en 7 de estos se detectó resistencia a colistina y en 3 a tigeciclina.

En 92 aislamientos se realizó caracterización molecular para identificación de tipo de KPC, 65 correspondían a KPC 2 (70%) y 27 a KPC 3 (30%). En los 143 eventos se buscaron genes para otras beta lactamasas ; en 53(37.1%) de ellos se encontró el gen *bla*_{TEM} y en 38 (26,6%) *bla*_{CTX-M}. Se identificó coproducción en 25 (17.5%) eventos que codificaron para TEM y CTX-M. No hubo amplificación de genes GES, NDM, OXA-48 y VIM.

7.3 Objetivo 3 . Determinar la relación genética de los aislamientos por medio de PFGE (Electroforesis campo pulsado) y MLST

Los análisis de PFGE identificaron 46 clones diferentes; los más frecuentes fueron el 4, 19 y 37 identificados en 32 eventos (de 16 pacientes), 9 eventos (de 6 pacientes) y 8 eventos (de 8 pacientes), respectivamente. Los ST identificados en los clones de mayor circulación (diversidad intra-institución) y en algunos eventos procedentes de un mismo paciente (diversidad intra-paciente fueron: ST258 (clon 4), asociado al clon pandémico, ST504 (clon 17), ST485 (clon 19), ST4239 (clon 22 y 49), ST111 (clon 37), ST65 (clon 39), ST1407 (clon 23), ST54 (clon 41), ST133 (clon 10), ST520 (clon 36), ST846 (clon 21), ST1310 (clon 24) y ST4959 (clon 18) Tabla 7-4 y gráfico 7-2

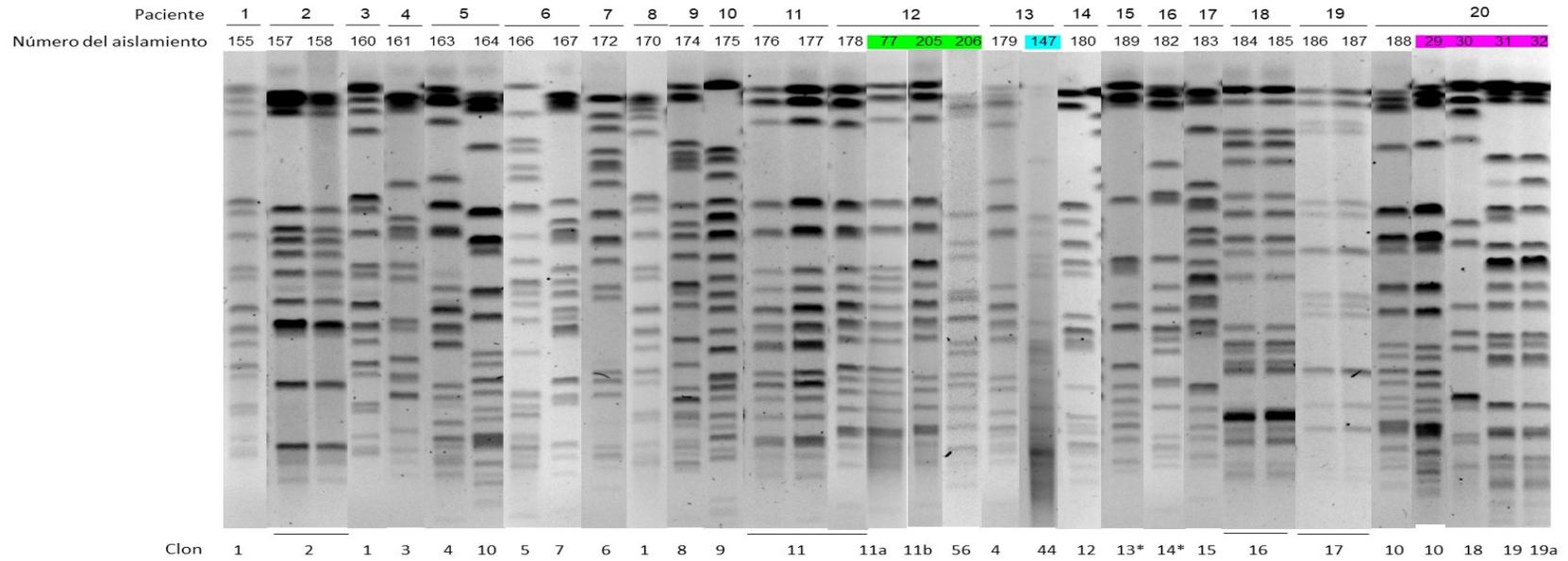
Tabla 7-4 . Distribución clonal *K. pneumoniae* bla_{KPC} 2014-106

CLON	2014	2015	2016	TOTAL n(%)	ST
1	3	0	0	3 (2.1%)	
2	2	0	0	2 (1.4%)	
3	1	0	0	1 (0.7%)	
4	2	19	11	32(22.4%)	258
5	1	0	0	1 (0.7%)	
6	1	0	0	1 (0.7%)	
7	1	0	0	1 (0.7%)	
8	1	0	0	1 (0.7%)	
9	1	0	0	1 (0.7%)	
10	2	1	0	3 (2.1%)	133
11	3	0	0	3 (2.1%)	
12	1	0	0	1 (0.7%)	
13	1	0	0	1 (0.7%)	
14	1	1	0	2 (1.4%)	
15	1	0	0	1 (0.7%)	
16	2	0	0	2 (1.4%)	
17	2	4	0	6 (4.2%)	2086
18	0	1	0	1 (0.7%)	4959
19	0	6	3	9 (6.3%)	485
20	0	1	0	1 (0.7%)	
21	0	1	0	1 (0.7%)	846
22	0	10	0	10(6.9%)	4239
23	0	4	0	4(2.8%)	1407
24	0	1	2	3 (2.1%)	1310
25	0	1	0	1 (0.7%)	
26	0	1	0	1 (0.7%)	
27	0	1	0	1 (0.7%)	
28	0	2	0	2 (1.4%)	
29	0	1	0	1 (0.7%)	
30	0	1	0	1 (0.7%)	
31	0	0	1	1 (0.7%)	
32	0	0	4	4(2.8%)	
33	0	0	1	1 (0.7%)	
34	0	0	1	1 (0.7%)	
35	0	0	1	1 (0.7%)	
36	0	0	4	4(2.8%)	520
37	0	0	8	8 (5.6%)	111
38	0	0	2	2 (1.4%)	
39	0	0	6	6 (4.2%)	65
40	0	0	1	1 (0.7%)	
41	0	0	3	3 (2.1%)	54
42	0	0	1	1 (0.7%)	
43	0	0	1	1 (0.7%)	
44	0	0	4	4(2.8%)	
45	0	0	3	3 (2.1%)	
46	0	0	1	1 (0.7%)	
ND	0	0	5	5 (3.5%)	

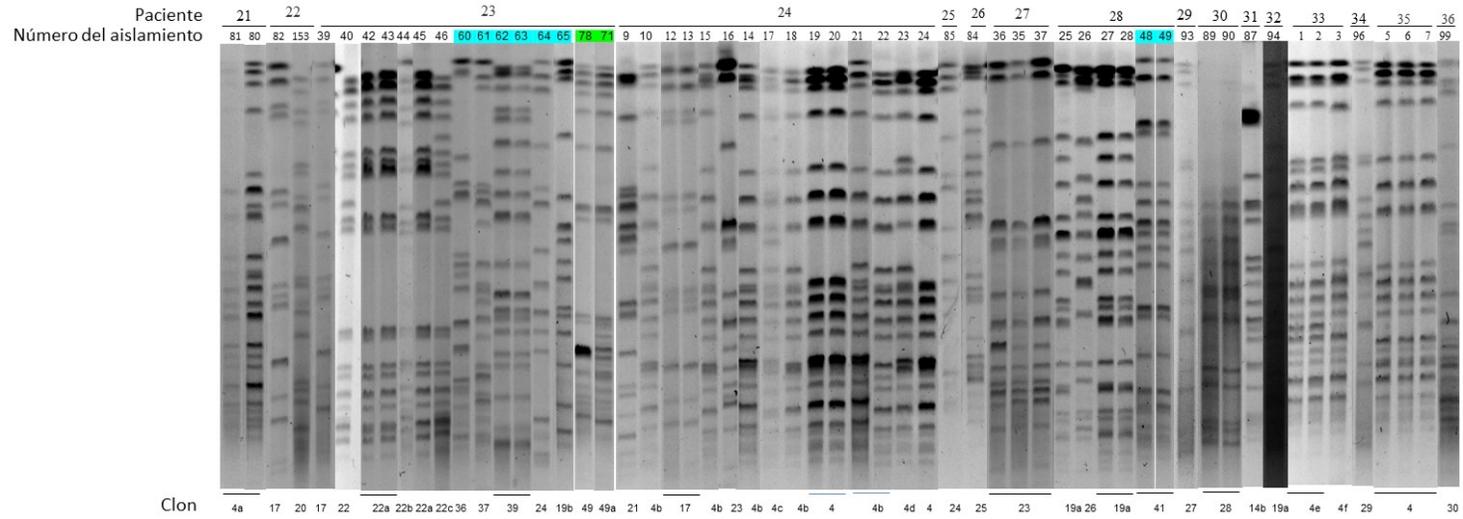
Gráfico 7-2. Distribución por paciente de los clones de *Klebsiella pneumoniae* bla_{KPC} 2014-2016

(A) 2014, (B) 2015, (C) 2016. Se ilustra el número de paciente en la parte superior, el número del aislamiento, la imagen del pulsotipo y el número de clon asignado.

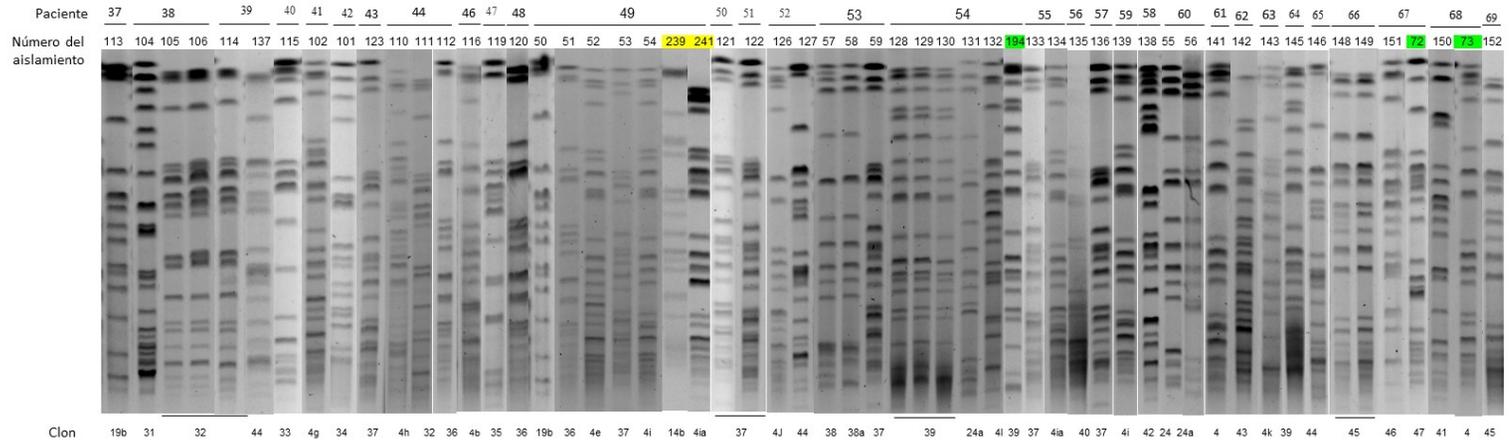
A



B



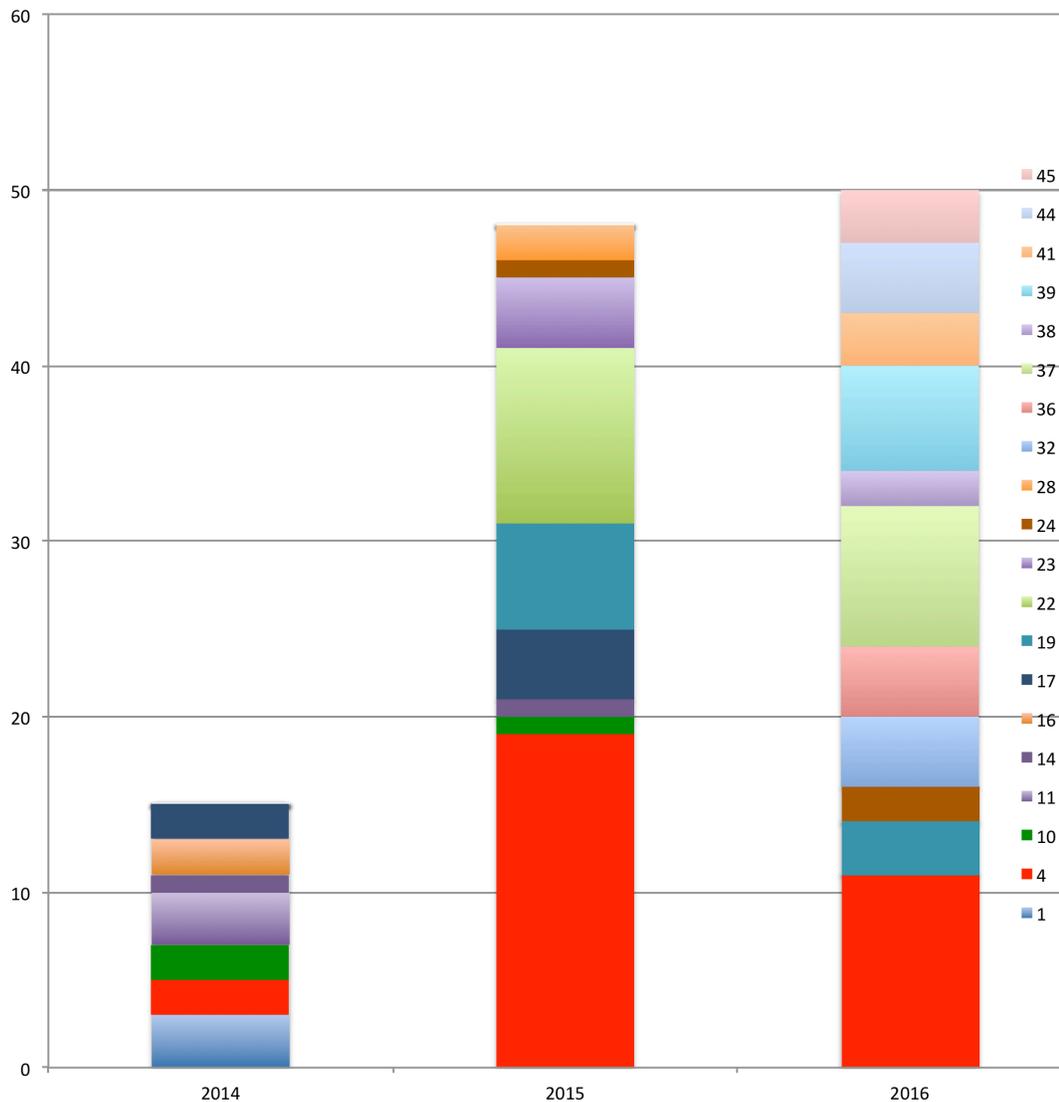
C



De los 46 clones identificados, 25 solo se presentaron 1 vez; por su parte el clon 4 circulo durante los 3 años en la institución. De igual forma se identificó la permanencia de 5 clones durante más de 1 año: los clones 10,14 ,17 en 2014 y 2015 y los clones 19 y 24 en 2015 y 2016. Gráfica 7-2.

Gráfico 7-3. Diversidad clonal en eventos por Kp-KPC 2014-2016

Gráfico 2. Diversidad clonal en eventos por Kp-KPC 2014-2016



Se muestra la frecuencia de los principales clones circulando cada año en la institución. El clon 4 se identificó los 4 años, los clones 10,14 y 17 se identificaron en 2014 y 2015; los clones 19 y 24 se identificaron en 2015 y 2016

Al comparar las características de los pacientes ajustadas por tipo de clon (4 versus no 4) se encontró como única diferencia significativa la edad con una mediana de 71 años en el primer grupo y de 52 años en el segundo (p 0.03) Tabla7-5. De igual forma se compararon los perfiles de resistencia de los eventos agrupados en las mismas categorías y se encontró mayor frecuencia de resistencia a quinolonas (90% vs 54%, p < 0,005), amikacina (34% vs 7%), p < 0,005 y gentamicina (90% vs 21%, p < 0,005) en los eventos generados por Kp-KPC clon 4; la frecuencia de *bla*_{TEM} y *CTX-M* tuvo el mismo comportamiento con diferencias significativas. Tabla 7-6

Tabla 7-5. Características clínicas de pacientes agrupadas por pulsotipo

Variable	PULSOTIPO 4 n=16	Pulsotipo No 4 n=53	p
Edad (Mediana)	71	52	0,03
Sexo (Hombre/mujer)	8/8	28/25	0,9
Estancia hospitalaria (Mediana)	33	29	0,6
Ingreso UCI (si/no)	9/7	35/18	0,47
Causa de Hospitalización (Médica/Quirúrgica)	10/6	23/30	0,18
Clínicamente significativo (Infección/colonización)	23/9	61/47	0,1
Charlson (mediana)	5	4	0,43
Muerte/vivo	2/14	10/43	0,55

Tabla 7-6. Resistencia antibiótica de los eventos y presencia de otras β - lactamasas agrupada por pulsotipo

Antibiótico	Número de eventos con resistencia	Pulsotipo 4 n=32	Pulsotipo NO 4 n=111	p
Ciprofloxacina	90	29 (90%)	61(54%)	Menor 0.05
Amikacina	19	11(34%)	8(7%)	Menor 0.05
Gentamicina	53	29(90%)	24(21%)	Menor 0.05
Polimixina	7	1(3%)	6(5%)	0.74
Tigeciclina	3	1(3%)	2 (1.8%)	0.16
Otras beta lactamasas	Número de eventos con la BLEE			
TEM	53	26 (81%)	27(25%)	Menor 0.05
CTX-M	38	21(65%)	17(15%)	Menor 0.05

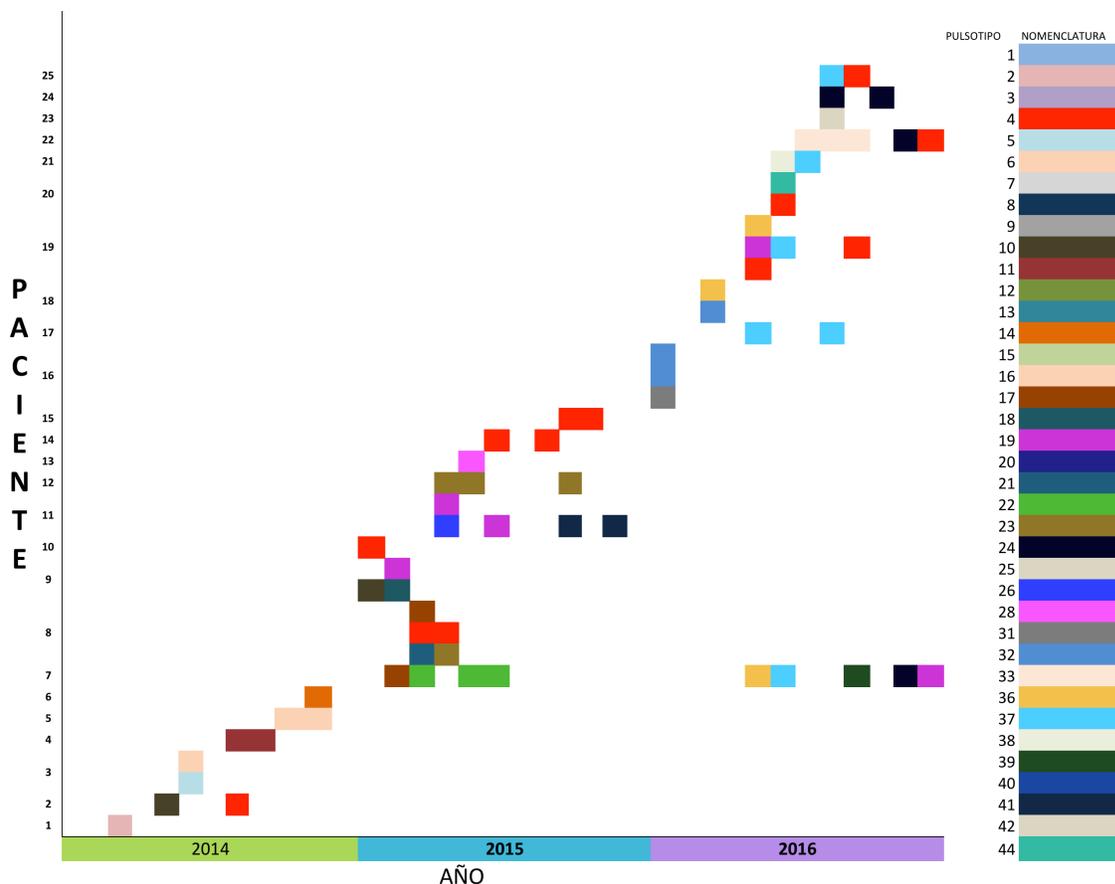
De los 27 pacientes que presentaron más de un evento, en 14 el clon fue el mismo , mientras que en 13 se documentó diversidad clonal; el promedio de pulsotipos en eventos de un mismo sujeto fue 2.9 (rango de 2 a 6). En uno de los casos se identificaron 6 clones (17,22,36,37,39 y 19) en 13 eventos, con 8 ingresos hospitalarios en los 3 años y el clon que predominó fue el 22 (en 5 de los 13 aislamientos). Otro de los pacientes presentó en 15 eventos 4 clones diferentes

(4,17,21 y 23) que se registraron en una única hospitalización de 43 días, en este el clon 4 predominó (10 de 15); fue el primero en registrarse el día 9 de hospitalización (posterior a la realización de trasplante hepático) y también el último el día 43 cuando fallece. Esta diversidad clonal se resume en el Tabla 7-7. En la gráfica 7-3 se representa el comportamiento multiclonal por paciente y la evolución de los clones a lo largo de los 3 años.

Tabla 7-7. Multiclonalidad en eventos de un mismo paciente

Paciente	Número de eventos	Numero pulsotipos	Pulsotipos identificados
7	13	6	17,22,36,37,39,19
8	15	4	4,17,21,23
9	5	3	10,18,19
10	7	3	19,26,41
11	3	2	31,32
16	4	3	4,32,36
19	5	4	4,37,19,36
20	2	2	4, 44
21	3	2	38,37
22	6	3	4,24,39
25	2	2	4,37
2	2	2	4,10
3	2	2	5,7

Gráfico 7- 4. Diversidad clonal en pacientes y comportamiento de clones en los 3 años



7.4 Objetivo 4 y 5. Establecer la secuencia del genoma de los principales linajes genéticos identificados en la población de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* seleccionados y describir cambios genómicos de algunos aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos procedentes de un mismo paciente tras el uso de diferentes tipos de antibióticos indicados para este tipo de infecciones.

La gráfica 7-5 muestra la evolución molecular (y genómica) de 15 eventos proveniente de la paciente No 8 mencionada en el punto anterior quien ingresó para realización de trasplante hepático por cirrosis biliar primaria. Se trató de una mujer de 54 años quien tuvo una estancia hospitalaria de 43 días. En la totalidad de su hospitalización se documentaron 16 eventos de diferentes fuentes por Kp-KPC. El día 9 de estancia, posterior al trasplante, se informó el primer aislamiento de Kp-KPC en orina; con diagnóstico de Infección urinaria se inició Meropenem y

Fosfomicina trometamol. Luego de 10 días presentó 2 nuevos eventos: 1 procedente de una colección intraabdominal y otro nuevamente de orina. El día 30 de hospitalización se diagnosticó absceso hepático y en el cultivo del drenaje se obtuvo otra Kp-KPC ; reinician Meropenem, asocian amikacina y fosfomicina disódica (In vitro con sensibilidad a estos 2 antibióticos) . En adelante se documentaron 12 nuevos eventos por Kp-KPC con este microorganismo , manteniéndose el mismo esquema antibiótico hasta el día 43 cuando fallece (posterior a un trasplante) . 15 de estas muestras se analizaron molecularmente; se identificaron 4 clones diferentes: 4 (ST258), 17 (ST504), 21 (ST846) y 23 (ST1407). En 3 aislamientos se realizó secuenciación genómica (denominadas 33Kpn 9, 33Kpn12 y 33 Kpn 22); el primer aislamiento era clon 21 (ST 846), el segundo clon 17 (ST 504) y el tercero clon 4 (ST 258). Aunque los cambios en los perfiles de susceptibilidad de los aislamientos no fueron asociados a clones específicos, en los eventos iniciales, los aislamientos presentaron susceptibilidad frente a los aminoglucósidos y conforme continuó la presión selectiva a estos antibióticos se presentó en forma progresiva un incremento en la concentración mínima inhibitoria (CMI) hasta finalmente evidenciar aislamientos resistentes. Al igual que el comportamiento global institucional el clon que predominó fue el ST 258 .

Los análisis detallados de la comparación del resistoma de los tres aislamientos secuenciados, 33Kpn9 (ST846), 33Kpn12 (ST504) y 33Kpn22 (ST258), con la terapia antibiótica seleccionada, mostraron que los aislamientos tenían mecanismos de resistencia a todas las opciones terapéuticas empleadas, lo que seguramente dificultó el éxito del tratamiento. En el caso de los β -lactámicos, además del gen constitutivo de la especie *bla*_{SHV} y del gen *bla*_{KPC} previamente identificado, fueron determinados genes de resistencia que codificaban para las β LEE, TEM, CTX-M y OXA. En cuanto a la fosfomicina, antibiótico empleado durante la mayoría de la estancia hospitalaria, se resalta para todos los aislamientos la presencia del gen *fosA* en cromosoma, el cual codifica para una glutatión S-transferasa dimérica dependiente de Mn^{2+} y K^+ que cataliza la adición de glutatión al anillo epóxido de la fosfomicina, inactivando al antibiótico[51]. Para el caso de los aminoglicósidos, se identificaron una gran variedad de genes que codificaban diferentes Aminoglucósido-acetiltransferasas (AAC), Aminoglucósido-fosfotransferasas (APH) y Aminoglucósido-adeniltransferasas (AAD), sin embargo, se observó que, durante la presión selectiva ejercida con la administración de la amikacina, el número de genes de resistencia a estos antibióticos fue aumentando en los aislamientos.

En la tabla 7-8 se muestran algunos parámetros obtenidos en el proceso de secuenciación y el número de contigs obtenidos para cada uno de los aislamientos, destacando que todos tuvieron extremos repetidos sugiriendo que son estructuras circulares completas. La secuencia total de los cromosomas tuvo una longitud promedio de 5 Mb y el número de plásmidos varió entre 2 y 5, con tamaños variables (tabla 9).

Tabla 7-8. Análisis general de los ensamblajes de los genomas de los tres aislamientos identificados en el paciente 8

Fase	Variable	33Kpn9 (ST846)	33Kpn12 (ST504)	33Kpn22 (ST258)
Pre- ensamblaje	Número de lecturas	97.161	151.390	83.690
	Número de bases	982'927.925	1.564'434.672	892'397.140
Ensamblaje	Número contigs	3	3	6
	Longitud total (pb)	5'721.946	5'418.559	6'102.548
	Longitud del contig más largo (pb)	5'464.147	5'285.656	5'501.536
	GC (%)	57.15	57.22	56.58
	N50	5'464.147	5'285.656	5'501.536
	L50	1	1	1
Post- ensamblaje	Número de N's por 100 Kbp	0	0	0
	Contigs con extremos repetidos	3	3	6
	Número de plásmidos completos	2	2	5

ST: tipo de secuencia. pb: pares de bases.

La secuenciación de los genomas permitió confirmar que los tres clones fueron genéticamente diferentes, como había sido sugerido por los análisis de PFGE y MLST, además albergaron estructuras plasmídicas diversas y diferentes de genes de resistencia, incluyendo variantes diferentes del gen *bla_{KPC}*. Interesantemente, este gen fue movilizado en diferentes plataformas genéticas, incluso el aislamiento 33Kpn22 (clon 4-ST258) contiene dos copias del gen (una cromosomal y otra plasmídica), lo cual podría incrementar su MIC a carbapenémicos Tabla 7-9.

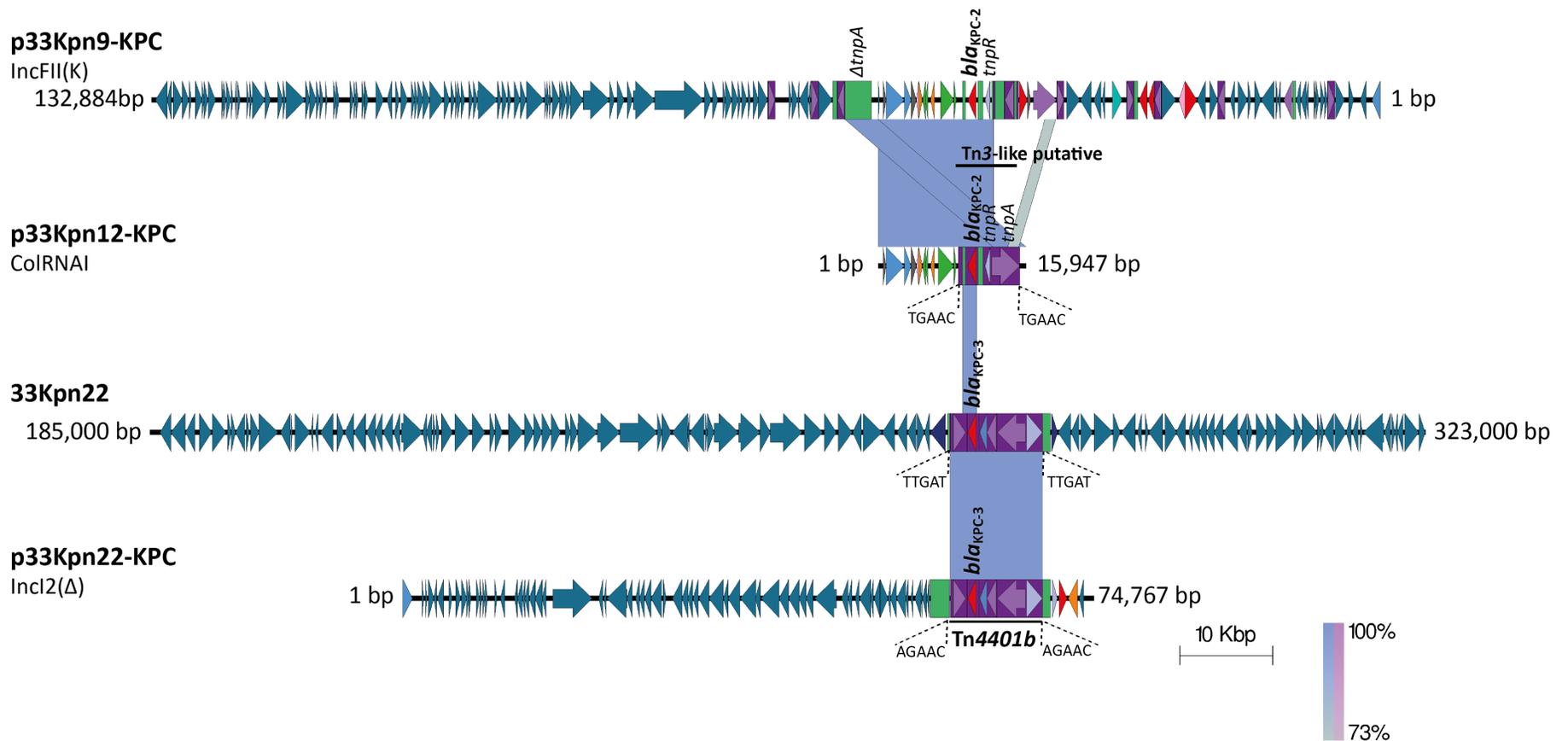
El análisis comparativo de las regiones adyacentes a *bla_{KPC}* en las secuencias de estos tres aislamientos, permitió establecer inicialmente la presencia de dos transposones de la familia Tn3, Tn3-like y Tn4401b, los cuales estuvieron involucrados en la adquisición de este gen de resistencia (figura 3). El Tn3-like, es un nuevo transposón putativo identificado en el plásmido p33Kpn12, el cual está conformado por los genes *tnpA* y *tnpR*, los cuales codifican para la transposasa y resolvasa, necesarios para la movilización del elemento genético con el gen *bla_{KPC-2}* que curiosamente, está flanqueado por los genes truncados: Δ *tnpA* y Δ *bla_{TEM}*. Por su parte, el Tn4401b se asoció a la variante del gen *bla_{KPC-3}* y fue identificado tanto en el cromosoma como en el plásmido del aislamiento 33Kpn22,

lo que sugiere una movilización de este transposón, ampliamente descrito en la literatura, posiblemente desde el plásmido hacia el cromosoma, evento que permite la estabilización del mecanismo de resistencia en la progenie de esta bacteria.

Tabla 7-9. Determinación y localización de los genes de resistencia de 3 aislamientos representativos identificados en el paciente 8.

Aislamiento	Clon (ST)	Estructuras	Características	Genes de resistencia
33Kpn9	21 (ST846)	Cromosoma	5'464.147 pb	<i>bla_{SHV-1}</i> , <i>fosA</i> y <i>oqxAB</i>
		p33Kpn9-KPC	132.884 pb, IncFII(K)	<i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{OXA-1}</i> , <i>bla_{KPC-2}</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>drfA14</i> , <i>tetA</i> y <i>catB3</i>
		p33Kpn9-2	124.915 pb, IncFIB(K)	-
33Kpn12	17 (ST504)	Cromosoma	5'285.656 pb	<i>bla_{SHV-42}</i> , <i>fosA</i> y <i>oqxAB</i>
		p33Kpn12-1	116.955 pb, IncN	<i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> , <i>aadA16</i> , <i>aph(6)-ld</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> , <i>drfA27</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> y <i>arr3</i>
		p33Kpn12-KPC	15,946 pb ColRNAI	<i>bla_{TEM-1}</i> y <i>bla_{KPC-2}</i>
33Kpn22	(4b-ST258)	Cromosoma	5'501.536 pb	<i>bla_{SHV-182}</i> , <i>bla_{KPC-3}</i> , <i>fosA</i> y <i>oqxAB</i>
		p33Kpn22-1	196.777 pb IncF	<i>catA1</i>
		p33Kpn22-2	174.177 pb	-
		p33Kpn22-3	107.862 pb, IncFII(Yp)	<i>bla_{SHV-12}</i> , <i>aac(6')-lb</i> (dos copias) y dos <i>aac(6')-lb-cr</i> (dos copias).
		p33Kpn22-KPC	74.766 pb, IncI2(Δ)	<i>bla_{TEM1A}</i> y <i>bla_{KPC-3}</i>
		p33Kpn22-5	47.425 pb, IncR	<i>aac(3)-IV</i> , <i>aac(6')-lb</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2b</i> , <i>aph(4)-la</i> , <i>cmlA1</i> , <i>aac(6')-lb-cr</i> y <i>sul3</i>

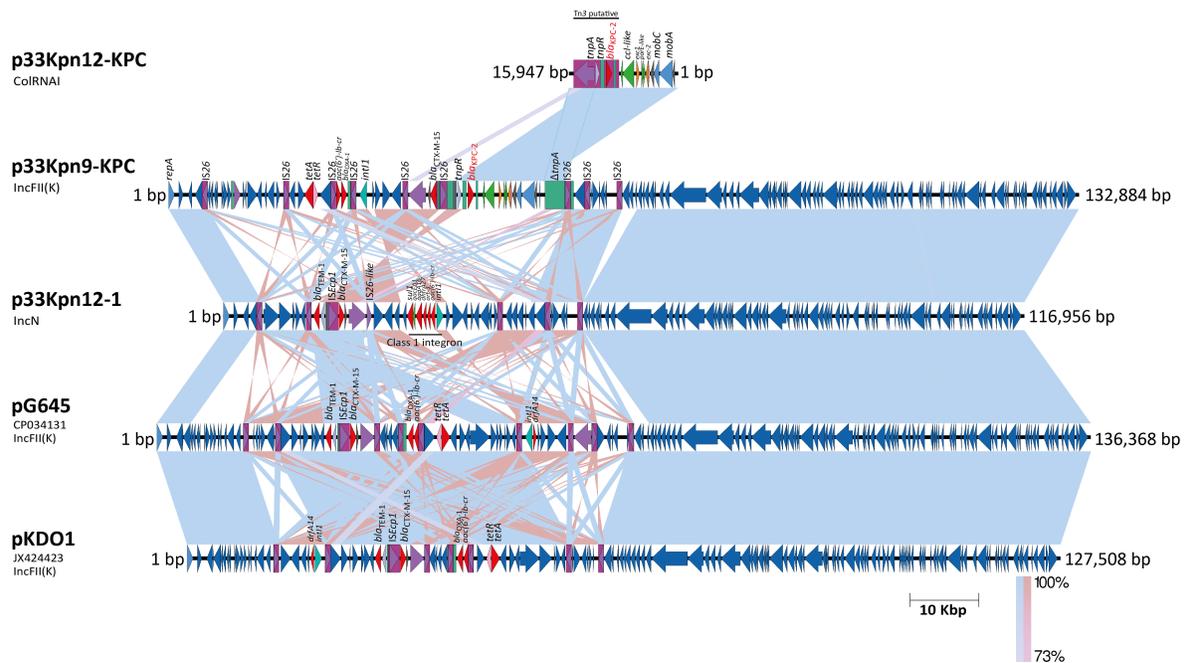
Con el fin de establecer si estos transposones fueron las plataformas que promovieron el establecimiento de *bla_{KPC}* tanto en los plásmidos como en el cromosoma de los aislamientos, dependiendo de cada caso, se hizo un análisis de la duplicación del sitio diana [del inglés *target site duplication* (TSD)] asociado al evento de transposición, mediante el cual se determinó una “huella” de cinco nucleótidos generada por la movilización de los transposones en cada una de las secuencias Gráfica 7-6.



Gráfica7-6. Análisis genómico comparativo en eventos Kp-KPC de paciente 8

Se muestran las secuencias que albergaron el gen *blaKPC* en los aislamientos 33Kpn9, 33Kpn12 y 33Kpn22. La zona sombreada entre las secuencias delimita las regiones de alineamiento con un porcentaje de identidad $\geq 73\%$. Las flechas azules indican los marcos abiertos de lectura y, adyacente al gen de interés, se resaltan las regiones codificantes para proteínas hipotéticas (gris), transposasas (púrpura), resolvasas (lila), genes de resistencia (rojo) y se delimita en un rectángulo morado a los transposones. Los sitios de duplicación (TSD) generados por la transposición fueron ilustrados y delimitados en líneas punteadas para cada elemento genético móvil. La gráfica cuenta con una línea de escala de 10.000 pb.

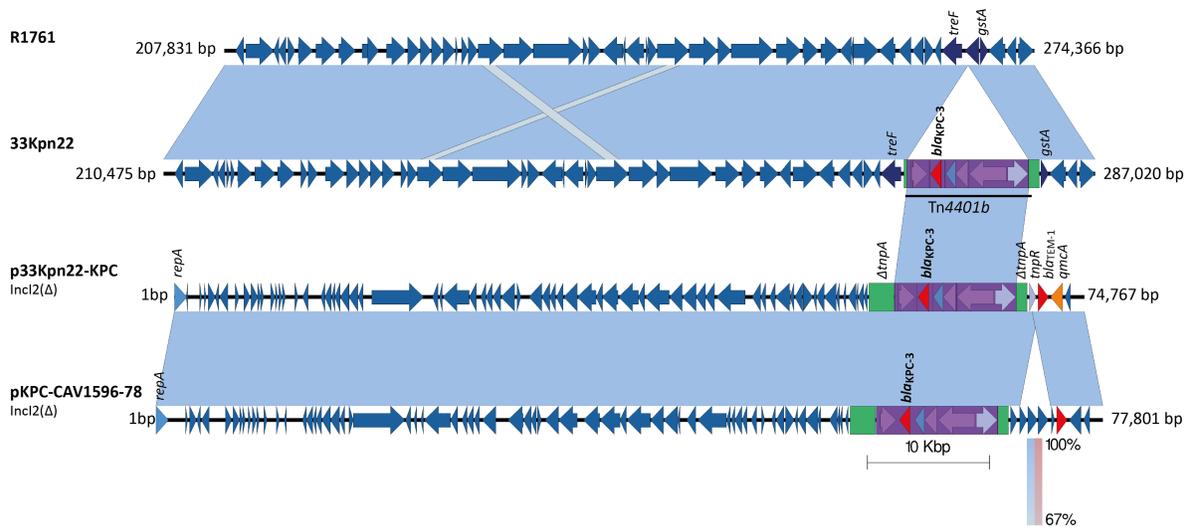
Aunque las secuencias que albergaron al gen *bla*_{KPC} fueron diferentes, la comparación de los plásmidos de los aislamientos 33Kpn9 y 33Kpn12, reveló dos resultados muy interesantes. El primero fue asociado a la secuencia del p33Kpn12-KPC, la cual se encontró 100% en el p33Kpn9-KPC, siendo 99,7% idéntica, con un cambio asociado al gen *tnpA* del transposón Tn3-like putativo, el cual se ubicó al inicio de la región en este último plásmido y fue truncado por una IS26 (figura 3). Por otra parte, el p33Kpn9-KPC presentó también una cobertura del 80% e identidad del 99,86% con el plásmido p33Kpn12-1 Gráfica 7-7. Curiosamente, esta región de cobertura fue conservada con > 99,6% de identidad con los plásmidos pG4584 y pKDO1 previamente identificados en *Klebsiella pneumoniae* y *K. quasipneumoniae*, respectivamente. Los cuales fueron asociados únicamente a los genes de resistencia a β -lactámicos *bla*_{TEM-1} y *bla*_{CTX-M-15}. Estos resultados sugieren que posiblemente el plásmido p33Kpn12-KPC se insertó en otro plásmido con la estructura conservada de los plásmidos p33Kpn12-1, pG4584 y pKDO1, en el cual se movilizaron otros genes de resistencia mediante las IS26, dando origen al plásmido p33Kpn9. Así mismo, el p33Kpn12-KPC, posiblemente se movilizó del aislamiento 33Kpn9 (ST846) al 33Kpn12 (ST504), preservando la resistencia a carbapenémicos en diferentes clones de la paciente 8.



Gráfica 7-7 . Comparación de los plásmidos determinados en los aislamientos 33Kpn9 y 33Kpn12 con los plásmidos IncFII(K) previamente reportados.

La zona sombreada entre las secuencias delimita las regiones de alineamiento con un porcentaje de identidad $\geq 73\%$. Las flechas azules indican los marcos abiertos de lectura y, adyacente al gen de interés, se resaltan las regiones codificantes para proteínas hipotéticas (gris), transposasas (púrpura), resolvasas (lila), genes de resistencia (rojo) y se delimita en un rectángulo morado a los transposones. Los sitios de duplicación (TSD) generados por la transposición fueron ilustrados y delimitados en líneas punteadas para cada elemento genético móvil. La gráfica cuenta con una línea de escala de 10.000 pb.

Por otra parte, en el cromosoma del aislamiento 33Kpn22 (ST258), se determinó que el *Tn4401b* fue el responsable de la movilización de *bla_{KPC-3}*. Sin embargo, para establecer si la inserción de este gen de resistencia estuvo asociada únicamente a este transposón, se realizó una comparación cromosomal de los aislamientos de *K. pneumoniae* 33Kpn22 y R1761. Este análisis permitió determinar que el *Tn4401b* fue el único elemento genético responsable de la inserción cromosomal de *bla_{KPC-3}*, el cual se movilizó dentro de un gen que codifica para una alcohol deshidrogenasa, el cual se encuentra flanqueado por los genes *trfF* y *gstA* Gráfica 7-8



Gráfica 7-8. Inserción del *Tn4401b* del plásmido Incl2(Δ) en el cromosoma del aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* 33Kpn22.

La zona sombreada entre las secuencias delimita las regiones de alineamiento con un porcentaje de identidad $\geq 67\%$. Las flechas azules indican los marcos abiertos de lectura y, adyacente al gen de interés, se resaltan las regiones codificantes para transposasas (púrpura), resolvasas (lila), genes de resistencia (rojo) se delimita en un rectángulo morado a los transposones. Los sitios de duplicación (TSD) generados por la transposición fueron ilustrados y delimitados en líneas punteadas para cada elemento genético móvil. La gráfica cuenta con una línea de escala de 10.000 pb.

La transposición replicativa del *Tn4401b* en el cromosoma del aislamiento 33Kpn22 se originó probablemente a partir de la copia de este transposón en el plásmido p33Kpn22-KPC. La secuencia de este plásmido albergando al *Tn4401b* ya ha sido descrita previamente en *K. pneumoniae* en plásmidos de los aislamientos CAV1596, DMC1097, BK15692 y AR00112, los cuales presentaron una cobertura e identidad $\geq 99\%$ con respecto al p33Kpn22-KPC Gráfica 7-7.

Estos resultados, sumados a los descritos previamente en este aislamiento ST258 nos sugieren que la co-circulación de diferentes plásmidos en la misma bacteria, como fue el caso de 33Kpn22, quien albergó a cinco plásmidos con múltiples genes de resistencia, incluyendo a *bla*_{KPC-3}, el cual fue movilizado al cromosoma mediante elementos genéticos móviles como el *Tn4401b*, le brindan mayor capacidad de adaptación y selección frente a los diferentes tratamientos antibióticos empleados, promoviendo la frecuencia de aparición de este clon en las infecciones por *K. pneumoniae*.

En la gráfica 7-9 se presenta el paciente 10 , quien tuvo una estancia hospitalaria prolongada (691 días). Se trata de una de mujer de 63 años atendida durante el 2015 y 2016 con diagnóstico de carcinoma gástrico en quien se realizó reconstrucción gastroyeyunal y presentó múltiples complicaciones, fístulas entéricas y peritonitis, con requerimiento de lavados peritoneales a repetición, falla intestinal secundaria y necesidad de nutrición parenteral exclusiva; presentó múltiples complicaciones infecciosas con diversos aislamientos microbiológicos ; falleció por sepsis de origen abdominal con disfunción multiorgánica asociada. Durante su estancia se documentaron siete eventos con aislamientos de Kp-KPC, el primero de ellos en el día 93 de hospitalización. Tres aislamientos fueron asociados al clon 19 (ST485), uno al clon 26 y los dos últimos al clon 41 (ST54). No se logró obtener la relación genética del quinto aislamiento, por lo cual este fue marcado como no determinado (ND). Al analizar el tratamiento antibiótico recibido, no se observó una selección de un clon en particular como en el caso anterior, de igual manera, la paciente no tuvo clones asociados al ST258. Teniendo en cuenta los cambios del perfil de susceptibilidad en los aislamientos, no se observaron diferencias asociadas a clones particulares, sin embargo, en el clon 19 se encontró un incremento de la CMI a colistina, posterior a altas dosis consecutivas con polimixina B .

8. DISCUSIÓN

Los resultados del estudio muestran el comportamiento policlonal de eventos por Kp-KPC en el período post endémico en una institución y en diferentes aislamientos de un mismo paciente, así como cambios en la epidemiología molecular de este microorganismo. El clon ST258 de *K. pneumoniae* es el más frecuente entre los clones resistentes a carbapenémicos y el de mayor diseminación a nivel mundial [30], fue el primero reportado en Colombia y el más frecuente; sin embargo en la actualidad se informan otros tipos de clones con gran variabilidad genética y diferencias en perfiles de resistencia; Ocampo [14] *et al* realizaron una descripción clínica y de vigilancia epidemiológica molecular en hospitales de Medellín en 2 años. Se incluyeron datos para 193 pacientes con infecciones por *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos, de ellos solo 37,8% correspondieron al CG 258, el 62% restante fueron clones diferentes entre ellos ST14, ST 17, ST 23, ST 140, ST 307, ST 147. Este fenómeno se presenta en otros países, como Italia donde Bonura *et al* lo reportan desde el 2014; en 94 muestras de *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos y gen *bla*_{KPC} identificaron 10 ST diferentes, el ST 258 correspondió al 40%, el ST 307 al 29% el y ST 273 al 18% [52]. Dortet *et al* en Francia en 2018 [15], informaron 15 clones diferentes de Kp-KPC y solo el 12% correspondían al GC 258 (ST 258 y ST 512); los más frecuentes fueron ST 307, ST 147 y ST 13.

El clon 4-ST258 fue identificado en los 3 años del periodo de estudio, lo que confirma su amplia capacidad de diseminación y persistencia como ha sido descrito en estudios globales y asociado a la producción de otras carbapenemasas como NDM y VIM. Notablemente, los clones 4-ST258, 39-ST65 y el 10-ST133 son los únicos que han sido reportados previamente asociados al gen *bla*_{KPC}; el ST65 en China y Argentina; y el ST133 descrito en Grecia. En América se han descrito tres ST, en México se reportó el ST846 portador de *bla*_{NDM}, el cual ya había sido asociado a esta carbapenemasa previamente en China; y en Estados Unidos se han determinado los tipos de secuencia 111 y 485,

los cuales han sido asociados a aislamientos no productores de carbapenemasas [53] [54]. Por su parte, el ST54 ha sido identificado en España y China, siendo relacionado con las metalo- β -lactamasas (M β L) NDM, IMP y VIM [54, 55]. Por otro lado en Colombia no se han reportado aislamientos de los ST520, ST1310, ST1407, ST4239, ST4959 lo cual brinda evidencia de la circulación de nuevos clones portadores de *bla*_{KPC}.

Esta diversidad clonal podría estar relacionada con fenómenos de presión selectiva y se deben considerar de importancia epidemiológica para los programas de control de infecciones. Los cambios en la epidemiología molecular también se sugieren por la mayor frecuencia de KPC2 respecto a KPC3 en la serie, a diferencia de datos publicados en años anteriores para Bogotá [20], sin embargo se deben analizar con cautela por tratarse de una sola institución.

La diversidad clonal en eventos procedentes de un mismo sujeto es un fenómeno que poco se ha reportado. Un individuo que ha recibido múltiples ciclos antibióticos y que haya presentado un proceso por Kp-KPC puede permanecer colonizado hasta por un año [22]; en la serie encontramos pacientes con estas características y que presentaron múltiples eventos por Kp-KPC en la misma o en diferentes hospitalizaciones. Desde el punto de vista clínico cada evento es interpretado como un mismo fenómeno, pero los análisis moleculares demuestran comportamientos genéticos diferenciales que se traducen en la expresión variable de resistencia y probablemente en el éxito o fracaso a la terapia antibiótica. Naas et al describen la evolución genómica de un aislamiento de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa ST 258 en un paciente que resultó infectado posterior a un procedimiento endoscópico. En un período de 4.5 años se documentaron 17 aislamientos por Kp-KPC. Se realizó secuenciación genómica de todos los eventos; los análisis filogenéticos demostraron que todas las muestras correspondieron al Clado I; el sujeto estuvo expuesto a diversos antibióticos lo que generó acumulación de mutaciones, pero sin adquisición de nuevos genes y con un plásmido que fue estable en el período de seguimiento; los cambios genéticos se presentaron a nivel cromosomal. Jousset et al reportan el

comportamiento molecular de 12 muestras de *K. pneumoniae* de un mismo paciente en 2 meses con técnica de secuenciación genómica; detectaron coexistencia de cepas sensibles y resistentes a carbapenémicos, todas pertenecientes al clon ST 512 y que solo se diferenciaban por la presencia o no del transposón 4401a (portador del gen *bla*_{KPC}) [56]. Se sugiere que la identificación de este fenómeno con métodos moleculares podría ser de importancia para la formulación de antimicrobianos y para el estudio de botes en una institución.

Si bien esta serie muestra gran diversidad clonal en Kp-KPC, el ST 258 sigue siendo el más prevalente y los factores de riesgo para infección y colonización por estos microorganismos no se han modificado y se conocen ampliamente en la literatura e incluyen uso previo de antibiótico, exposición a los ambientes hospitalarios, estancia en unidad de cuidado intensivo, trasplante de órgano, inmunosupresión por esteroides y uso de dispositivos médicos invasivos [57]. La mediana de edad reportada en otros estudios como el CRAKLE es mayor en comparación a nuestra serie (70 Vs 56 años) [30], pero la prevalencia de inmunosupresión, dada principalmente por trasplante de órgano sólido (hígado) y cáncer muestran la importancia de un huésped susceptible [58]. El éxito para la diseminación y persistencia del ST 258 se ha atribuido al transposón Tn 4401a [31, 39] el cual tiene la capacidad de pasar a plásmidos (que sufren procesos frecuentes de conjugación) pero al costo de perder varios factores de virulencia como los genes de antígenos capsulares K1, K2 y K5, genes de aerobactina y el gen regulador del genotipo mucóide *rmpA*. La importancia desde el punto de vista clínico en la diferenciación del tipo de ST aún no ha podido ser definida, algunos autores sugieren desenlaces diferentes; Marchaim *et al* en un reporte breve publicado en 2016 compararon 67 pacientes con aislamiento de *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos y ST 258 con 7 pacientes con ST diferentes; por el bajo número de muestra no se encontraron diferencias significativas, sin embargo el promedio de edad fue ligeramente mayor en el grupo de pacientes con ST 258 (65 Vs 63 años) y la resistencia a otros grupos de antibióticos como aminoglucósidos y quinolonas tuvo mayor frecuencia (100% Vs 50% y 98% Vs

60% respectivamente) [59]; Ocampo reporto resultados similares [14] En nuestra serie, al ajustar por tipo de clon los pacientes con por lo menos un evento por pulsotipo 4 tuvieron una media de edad mayor al compararse con aquellos que presentaron otros pulsotipos (72 vs 52 años), lo que sugiere comportamiento clínicos diferenciales y probablemente afectación a un grupo de pacientes con mayor vulnerabilidad. Se encontraron además diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de resistencia a Ciprofloxacina, amikacina y gentamicina en concordancia con los autores citados. Ocampo reporta coexistencia enzimática con TEM-1 (45%), CTX-M 15 (22%) y SHV -12 (17%), similar a los datos presentados ; en nuestra serie al ajustar por el tipo de clon resultaron más frecuentes TEM y CTX-M en aquellos eventos con pulsotipo 4. Estos datos apoyan la teoría de una ventaja selectiva del ST 258 genética mediada por el transposón y por genotipos particulares de multiresistencia [60].

En la población analizada nuevamente se evidencia la alta frecuencia de colonización por Kp-KPC y la persistencia de la misma a lo largo del tiempo a pesar de los múltiples ciclos de antibióticos que reciben los pacientes; las tasas de colonización nasofaríngea por *K. pneumoniae* se han informado entre 3 a 15% y son mayores en adultos que en niños; la colonización en el tracto gastrointestinal se ha reportado en 35% pero esta frecuencia se incrementa hasta el 77% en pacientes hospitalizados y quienes han recibido tratamiento antibiótico previo, ambas situaciones comunes en la población descrita [21]. La persistencia en la colonización por cepas de Kp-KPC puede prolongarse incluso más de un año[22]. Considerando que para el tiempo del estudio no se realizaba tamizaje para Kp-KPC rutinariamente en la institución, no es posible establecer el estado de colonización de los sujetos, sin embargo la mediana de tiempo para aparición del primer evento (8 días) y los factores de riesgo basales sugieren que muchos de ellos se encontraban colonizados al momento del ingreso, factores que se deben considerar en la toma de decisiones para control de infecciones.

Los análisis particulares de los pacientes muestran que son necesarias pruebas genéticas más específicas para direccionar un mejor tratamiento de los pacientes

en la práctica, puesto que en algunos casos las infecciones pueden ser causadas al mismo tiempo por uno o más clones de *Klebsiella pneumoniae*, los cuales son muchas veces imperceptibles tanto para el profesional del Laboratorio como por el médico que observa el análisis del antibiograma sin cambios específicos; lo que sumado al tratamiento antibiótico administrado puede generar una selección particular de clones más resistentes.

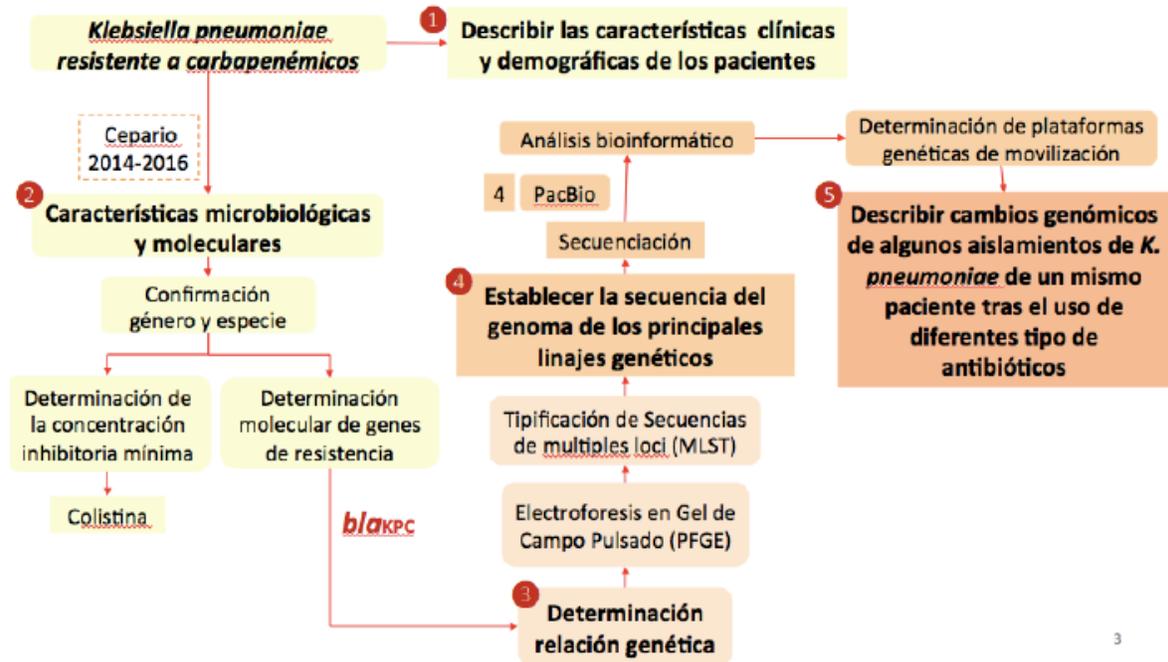
A nuestro conocimiento el reporte de multiclonalidad de Kp-KPC en muestras provenientes de un mismo paciente es el primero que se hace en el país; como debilidades del estudio por su naturaleza retrospectiva, en algunos casos no se contó con información completa de registros clínicos, la información de susceptibilidad antibiótica (específicamente para colistina y tigeciclina) no estuvo disponible en todos los eventos y no se realizaron ST para todos los clones.

9. CONCLUSIONES

1. La población afectada por Kp-KPC en esta serie comparte los factores de riesgo reportados en la literatura para este tipo de infecciones; es de anotar que comparada con otros estudios la mediana de edad resulta menor, sin embargo, tenían altos índices de comorbilidad e inmunosupresión (en su mayoría farmacológica, por trasplante hepático) y cáncer
2. Existe multiclonalidad intrainstitucional en eventos por Kp-KPC; si bien el más frecuente continúa siendo el ST 258, se reportan clones adicionales con potencial de persistencia a lo largo del tiempo. Esta multiclonalidad también se observa en eventos procedentes de un mismo paciente
3. Los pacientes con eventos por Kp-KPC con clon 4 (ST 258) en esta serie tuvieron medianas de edad mayores en comparación a aquellos con otro tipo de clon; adicionalmente estos eventos tuvieron mayor frecuencia de resistencia a otros grupos de antibióticos; esto sugiere comportamientos clínicos y microbiológicos diferenciales.
4. La vigilancia molecular en asilamientos por Kp-KPC se convierte en una herramienta no solo de tipo epidemiológico, sino con potencial en la toma de decisiones terapéuticas en sospecha de infecciones por clones multirresistente.

10. ANEXOS

ANEXO 1. Algoritmo de trabajo



3

ANEXO 2. Avals comité de ética



Bogotá, 10 de mayo de 2017

UB-441-2017

De: Vicerrectoría de Investigaciones - Comité de Ética *ad hoc*

Para: Javier Antonio Escobar Pérez. Laboratorio Genética Molecular Bacteriana

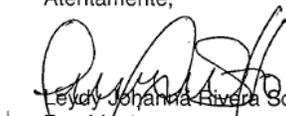
Asunto: Respuesta Comité de Ética *ad hoc*

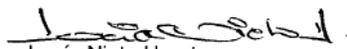
Respetado Investigador,

En el Comité de Ética *ad hoc* de la Vicerrectoría de Investigaciones (número 12 del 4 de mayo del 2017), se evaluó el proyecto titulado "Determinación del impacto del efecto post-endémico de los clones de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos en la presentación clínica de una institución de salud de tercer nivel en Bogotá" UB-441-2017 el cual se postula a la convocatoria 777 de salud de Colciencias del año 2017.

Por lo tanto este Comité afirma que el proyecto ha sido revisado y avalado en sus componentes éticos e instrumentos a emplear.

Atentamente,


Leydy Johanna Rivera Sotto
Presidente
e-mail: investigaciones@unbosque.edu.co


Lucía Nieto Huertas
Coordinadora
Vicerrectoría de Investigaciones

c.c. Laboratorio Genética Molecular Bacteriana

Página 1 | 1



CCEI-2726-2015
Bogotá, febrero 25 de 2015

Doctor
AURA LUCIA LEAL CASTRO
Investigador Principal

Ref. Protocolo: 'Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos clínicos de *K. Pneumoniae* con disminución de susceptibilidad o resistencia a carbapenémicos, recuperados de muestras que fueron procesadas en un Hospital Universitario de Bogotá - Colombia en el 2014'. Estudio descriptivo retrospectivo.

Cordial Saludo,

El Comité Corporativo de Ética en Investigación en reunión del 23 de Febrero de 2015 como consta en Acta 3 con un quórum del 93% siendo el mínimo el 50+1 integrado por 15 miembros permanentes. A la presente reunión se contó con la asistencia de Dr. Gustavo Adolfo Triana Rodríguez - Presidente, Radiólogo-Epidemiólogo; Dr. Klaus Mieth, Ortopedista- Epidemiólogo; Dr. Ricardo Martin, Ginecólogo- Epidemiólogo; Dr. Bernardo Moreno, Ginecólogo- Epidemiólogo; Dra. Diana Quijano, Otorrinolaringóloga- Epidemióloga; Dr. Carlos Felipe Perdomo, Cirujano-Epidemiólogo; Dra. Ana Cristina Palacio, Cardióloga-Bioeticista; Dra. Evelyne Halpert, Dermatóloga- Epidemióloga; Dra. Angela Caro, Química farmacéutica-Epidemióloga; Dr. José Fernando Vera, Gastroenterólogo-Pediatra-Epidemiólogo; Licenciada Margarita González - Enfermera-Bioeticista; Dra. Paula Prieto, Médico-Bioeticista; Sr. Lope Bernardo Holguín, Miembro de la Comunidad; y con la participación de la Dra. Raiza Deluque Curiel, Abogada como miembro consultor quien tiene derecho a voz pero no a voto, reciben , evalúan y aprueban los siguientes documentos:

1. Proyecto 'Caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos clínicos de *K. Pneumoniae* con disminución de susceptibilidad o resistencia a carbapenémicos, recuperados de muestras que fueron procesadas en un Hospital Universitario de Bogotá - Colombia en el 2014'. Estudio descriptivo retrospectivo.
2. Hoja de vida de la doctora Aura Lucia Leal como Investigadora Principal del estudio de la referencia.
3. Hojas de vida de los doctores María Mercedes Torres, Ana Yadira Santana, David Alfonso Suárez, Edna Catering Rodriguez, Diana María Palacios, Blanca Stella Vanegas, como Investigadores Secundarios del estudio de la referencia.

Además de conocer los antecedentes expuestos en su protocolo, este Comité consideró que el estudio presenta las siguientes observaciones:

1. Los Miembros del Comité declararon no tener conflicto de interés al igual que el investigador.
2. Presenta validez social y científica
3. Presenta una selección equitativa de sujetos
4. El diseño se ajusta a las normas de Investigación en Seres Humanos.
5. La razón de beneficio fue estimada aceptable.
6. El Protocolo se clasifica sin riesgo según Resolución 8430 del 4 de octubre de 1993.



7. Los antecedentes curriculares de los Investigadores garantizan la ejecución del Ensayo Clínico dentro de los marcos éticamente aceptables.

Doctora Leal, al ser aprobado este Proyecto de Investigación usted se compromete a:

1. Cumplir con los Principios Éticos de Respeto por las personas, Beneficencia y Justicia de acuerdo a Informe de Belmont.
2. Debe recordar que siempre debe haber una proporcionalidad entre el riesgo y el beneficio de acuerdo al Principio de Belmont.
3. Cumplir y hacer cumplir por parte de su equipo de trabajo las Regulaciones Nacionales establecidas para Investigación y a las cuales se acoge este Comité Resolución 8430 de 1993.
4. Debe mantener la privacidad y confidencialidad de los participantes.
5. Debe asegurar la veracidad de los datos de la investigación.
6. No aplicar cambios a los documentos aprobados en esta acta sin previo conocimiento y aprobación por parte de este Comité.
7. Cumplir con todas las solicitudes realizadas por este Comité, teniendo en cuenta que su incumplimiento se considerará una falta a la Buena Práctica Clínica.
8. Debe informarse de los resultados del estudio y comunicar los mismos a la comunidad en general en especial a los sujetos en investigación y al Comité de Ética.

Doctora Leal, el Comité le solicita enviar su informe de seguimiento o avances del proyecto y además las conclusiones del mismo de forma puntual para poder dar el aval en caso de su publicación.

De la misma manera informamos que el Comité Corporativo de Ética en Investigación desarrolla labores como Comité independiente (IRB/IEC), por lo cual se anexa listado vigente de sus miembros. Igualmente éste comité se adhiere al Reglamento Interno Versión 06 del 04 de febrero de 2013, a la Resolución 8430 de 1993, Resolución 2378 de 2008, Resolución No. 2011020764 del 10 de junio de 2011, Circular externa DG-100-00381-10, Guía ICH/GCP Tripartita y Armonizada para la Buena Práctica Clínica de 1996, Declaración de Helsinki (versión 59 th WMA General Assembly, Seoul, October 2008), Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en seres humanos (CIOMS) Ginebra 2002.

GUSTAVO ADOLFO TRIANA RODRIGUEZ
Presidente
Comité Corporativo de Ética en
Investigación
Telefax 6030303 Ext. 5402
comiteinvestigativo@fsfb.org.co

PAULA PRIETO
Miembro del Comité
Comité Corporativo de Ética en
Investigación

11. REFERENCIAS

1. Logan LK, Weinstein RA: **The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace.** *J Infect Dis* 2017, **215**(suppl_1):S28-s36.
2. Xu L, Sun X, Ma X: **Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*.** *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2017, **16**(1):18.
3. Iredell J, Brown J, Tagg K: **Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications.** *Bmj* 2016, **352**:h6420.
4. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC: **Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**(4):1151-1161.
5. Kaiser RM, Castanheira M, Jones RN, Tenover F, Lynfield R: **Trends in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-positive *K. pneumoniae* in US hospitals: report from the 2007-2009 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013, **76**(3):356-360.
6. Castanheira M, Farrell SE, Deshpande LM, Mendes RE, Jones RN: **Prevalence of β -lactamase-encoding genes among Enterobacteriaceae bacteremia isolates collected in 26 U.S. hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2010).** *Antimicrob Agents Chemother* 2013, **57**(7):3012-3020.
7. Guh AY, Bulens SN, Mu Y, Jacob JT, Reno J, Scott J, Wilson LE, Vaeth E, Lynfield R, Shaw KM *et al*: **Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in 7 US Communities, 2012-2013.** *Jama* 2015, **314**(14):1479-1487.
8. Villegas MV, Pallares CJ, Escandón-Vargas K, Hernández-Gómez C, Correa A, Álvarez C, Rosso F, Matta L, Luna C, Zurita J *et al*: **Characterization and Clinical Impact of Bloodstream Infection Caused by Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Seven Latin American Countries.** *PLOS ONE* 2016, **11**(4):e0154092.
9. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP: **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**(8):2880-2882.
10. Lopez JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Briceño DF, Montealegre MC, Quinn JP, Carmeli Y, Villegas MV: **Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain.** *Clin Microbiol Infect* 2011, **17**(1):52-56.
11. Cristhian Hernández-Gómez VMB, Gabriel Motoa, Adriana Correa, Juan José Maya, Elsa de la Cadena, Marcela Perengüez, Laura Rojas, Alejandra Hernández, Marta Vallejo,, María Virginia Villegas GdRBNeC: **Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos**

- Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia.** *Biomédica* 2014, **34**(1):9.
12. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK *et al*: **Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases.** *Lancet Infect Dis* 2013, **13**(9):785-796.
 13. Colombia GdMINdS: **Informe de resultados de la vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) 2018.** 2018:32.
 14. Ocampo AM, Chen L, Cienfuegos AV, Roncancio G, Chavda KD, Kreiswirth BN, Jiménez JN: **A Two-Year Surveillance in Five Colombian Tertiary Care Hospitals Reveals High Frequency of Non-CG258 Clones of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* with Distinct Clinical Characteristics.** *Antimicrob Agents Chemother* 2016, **60**(1):332-342.
 15. Rémy AB, Agnès BJ, Adriana C, Cécile E, Philippe G, Thierry N, Laurent D: **Emergence of New Non-Clonal Group 258 High-Risk Clones among *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae* Isolates, France.** *Emerging Infectious Disease journal* 2020, **26**(6):1212.
 16. organization WH: **Antimicrobial resistance: global report on surveillance.** 2014.
 17. Sciences CfDCaPDoHaH: **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.** 2013.
 18. Borer A, Saidel-Odes L, Riesenberk K, Eskira S, Peled N, Nativ R, Schlaeffer F, Sherf M: **Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009, **30**(10):972-976.
 19. Bleumin D, Cohen MJ, Moranne O, Esnault VL, Benenson S, Paltiel O, Tzukert K, Mor-Yosef Levi I, Ben-Dov IZ, Levi R *et al*: **Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* is associated with poor outcome in hemodialysis patients.** *J Infect* 2012, **65**(4):318-325.
 20. Edna Catering Rodríguez SYS, Aura Lucía Leal, Carlos Álvarez, Narda Olarte, Alberto Valderrama, Sonia Isabel Cuervo4 Javier Escobar: **Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años.** *Biomedica* 2014, **34**:4.
 21. Martin RM, Bachman MA: **Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*.** *Front Cell Infect Microbiol* 2018, **8**:4.
 22. Lübbert C, Lippmann N, Busch T, Kaisers UX, Ducomble T, Eckmanns T, Rodloff AC: **Long-term carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *K pneumoniae* after a large single-center outbreak in Germany.** *Am J Infect Control* 2014, **42**(4):376-380.
 23. Podschun R, Ullmann U: ***Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors.** *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**(4):589-603.
 24. Bishara J, Leibovici L, Huminer D, Drucker M, Samra Z, Konisberger H, Pitlik S: **Five-year prospective study of bacteraemic urinary tract infection in a single institution.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997, **16**(8):563-567.

25. Haeggman S, Löfdahl S, Burman LG: **An allelic variant of the chromosomal gene for class A beta-lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1.** *Antimicrob Agents Chemother* 1997, **41**(12):2705-2709.
26. Ovalle MV, Rojas SYS:
Resultados del Programa de Vigilancia por Laboratorio de Resistencia antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) 2016. Instituto nacional de salud INS. 2016.
27. INS IndS: **Informe infecciones asociados a dispositivos.** 2018.
28. Safdar N, Maki DG: **The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, enterococcus, gram-negative bacilli, *Clostridium difficile*, and *Candida*.** *Ann Intern Med* 2002, **136**(11):834-844.
29. Caballero S, Carter R, Ke X, Sušac B, Leiner IM, Kim GJ, Miller L, Ling L, Manova K, Pamer EG: **Distinct but Spatially Overlapping Intestinal Niches for Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*.** *PLoS Pathogens* 2015, **11**(9):e1005132.
30. van Duin D, Perez F, Rudin SD, Cober E, Hanrahan J, Ziegler J, Webber R, Fox J, Mason P, Richter SS *et al*: **Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: tracking molecular epidemiology and outcomes through a regional network.** *Antimicrob Agents Chemother* 2014, **58**(7):4035-4041.
31. Munoz-Price LS, Quinn JP: **The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: a tale of strains, plasmids, and transposons.** *Clin Infect Dis* 2009, **49**(11):1739-1741.
32. Munita JM, Arias CA: **Mechanisms of Antibiotic Resistance.** *Microbiol Spectr* 2016, **4**(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
33. Ana Mercedes Rada CH-G, Eliana Restrepo, María Virginia, Villegas:
Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica* 2019, **39**:21.
34. Espinal PA, Mantilla, J. R., Saavedra, C. H., Leal, A. L., Alpuche, C., & Valenzuela, E. M.: **Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido.** *Biomedica* 2004, **24**:9.
35. Bush K, Jacoby GA: **Updated Functional Classification of β -Lactamases.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010, **54**(3):969-976.
36. Poirel L, Potron A, Nordmann P: **OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace.** *J Antimicrob Chemother* 2012, **67**(7):1597-1606.
37. Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM: **First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(1):516-519.
38. Hall BG, Barlow M: **Revised Ambler classification of β -lactamases.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005, **55**(6):1050-1051.
39. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN: **Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding.** *Trends Microbiol* 2014, **22**(12):686-696.

40. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P: **Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**(4):1257-1263.
41. Tamma PD, Simner PJ: **Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates.** *J Clin Microbiol* 2018, **56**(11).
42. Murray PR: **What is new in clinical microbiology-microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology.** *J Mol Diagn* 2012, **14**(5):419-423.
43. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** *Science* 1988, **239**(4839):487-491.
44. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S: **Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR.** *J Antimicrob Chemother* 2012, **67**(4):906-909.
45. Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC: **Pulsed-field gel electrophoresis.** *Nat Protoc* 2007, **2**(3):677-684.
46. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S: **Multilocus sequence typing of Klebsiella pneumoniae nosocomial isolates.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**(8):4178-4182.
47. Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M, Rajandream MA, Barrell BG, Parkhill J: **ACT: the Artemis Comparison Tool.** *Bioinformatics* 2005, **21**(16):3422-3423.
48. Houtgast EJS, Vlad-Mihai ; Bertels, Koen ; Al-Ars, Zaid: **Hardware acceleration of BWA-MEM genomic short read mapping for longer read lengths.** *Computational Biology and Chemistry* 2018, **3**(75):54-64.
49. Seemann T: **Prokka: rapid prokaryotic genome annotation.** *Bioinformatics* 2014, **30**(14):2068-2069.
50. Hunt M, Silva ND, Otto TD, Parkhill J, Keane JA, Harris SR: **Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads.** *Genome Biol* 2015, **16**:294.
51. Bernat BA, Laughlin LT, Armstrong RN: **Fosfomycin resistance protein (FosA) is a manganese metalloglutathione transferase related to glyoxalase I and the extradiol dioxygenases.** *Biochemistry* 1997, **36**(11):3050-3055.
52. Bonura C, Giuffrè M, Aleo A, Fasciana T, Di Bernardo F, Stampone T, Giammanco A, Palma DM, Mammina C: **An Update of the Evolving Epidemic of blaKPC Carrying Klebsiella pneumoniae in Sicily, Italy, 2014: Emergence of Multiple Non-ST258 Clones.** *PLoS One* 2015, **10**(7):e0132936.
53. Bocanegra-Ibarias P, Garza-González E, Morfín-Otero R, Barrios H, Villarreal-Treviño L, Rodríguez-Noriega E, Garza-Ramos U, Petersen-Morfin S, Silva-Sanchez J: **Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying Enterobacteriaceae in Mexico.** *PLoS One* 2017, **12**(6):e0179651.
54. Jin Y, Song X, Liu Y, Wang Y, Zhang B, Fan H, Shao C: **Characteristics of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae as a cause of neonatal infection in Shandong, China.** *Exp Ther Med* 2017, **13**(3):1117-1126.

55. Hernández-García M, Pérez-Viso B, Carmen Turrientes M, Díaz-Agero C, López-Fresneña N, Bonten M, Malhotra-Kumar S, Ruiz-Garbajosa P, Cantón R: **Characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from colonized patients in a university hospital in Madrid, Spain, during the RGNOSIS project depicts increased clonal diversity over time with maintenance of high-risk clones.** *J Antimicrob Chemother* 2018, **73**(11):3039-3043.
56. Jousset AB, Bonnin RA, Takissian J, Girlich D, Mihaila L, Cabanel N, Dortet L, Glaser P, Naas T: **Concomitant carriage of KPC-producing and non-KPC-producing Klebsiella pneumoniae ST512 within a single patient.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020.
57. Liu P, Li X, Luo M, Xu X, Su K, Chen S, Qing Y, Li Y, Qiu J: **Risk Factors for Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Infection: A Meta-Analysis.** *Microb Drug Resist* 2018, **24**(2):190-198.
58. Sonia Isabel Cuervo RSJCG-R, Cielo Almenares JPO, María José Vargas: **Comportamiento de casos de Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasas en pacientes con cáncer de un hospital de tercer nivel de Bogotá, D.C.** *Biomedica* 2014, **34**:10.
59. Dhar S, Martin ET, Lephart PR, McRoberts JP, Chopra T, Burger TT, Tal-Jasper R, Hayakawa K, Ofer-Friedman H, Lazarovitch T *et al*: **Risk Factors and Outcomes for Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Isolation, Stratified by Its Multilocus Sequence Typing: ST258 Versus Non-ST258.** *Open Forum Infect Dis* 2016, **3**(1):ofv213.
60. Tzouvelekis LS, Miriagou V, Kotsakis SD, Spyridopoulou K, Athanasiou E, Karagouni E, Tzelepi E, Daikos GL: **KPC-producing, multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae sequence type 258 as a typical opportunistic pathogen.** *Antimicrob Agents Chemother* 2013, **57**(10):5144-5146.