



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Análisis genómico comparativo de  
aislamientos clínicos de *Klebsiella  
pneumoniae* productores de  
Carbapenemasas en pacientes con y  
sin SARS-CoV2 de la ciudad de  
Bogotá durante el periodo de  
pandemia**

**Alexandra Hernández Páez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Postgrado Interfacultades  
Bogotá, Colombia  
2023



# **Análisis genómico comparativo de aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productores de Carbapenemasas en pacientes con y sin SARS-CoV2 de la ciudad de Bogotá durante el periodo de pandemia**

**Alexandra Hernández Páez**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias-Microbiología**

Director (a):

PhD. Emiliano Barreto Hernández

Codirector (a):

Doctora. Aura Lucía Leal Castro

Línea de Investigación:

Biología Molecular de Agentes Infecciosos

Grupos de Investigación:

Bioinformática y Epidemiología Molecular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Postgrado Interfacultades

Bogotá, Colombia

2023



*“Conozca todas las teorías. Domine todas las técnicas, pero al tocar un alma humana sea apenas otra alma humana”*

*Carl G. Jung*



## Declaración de obra original

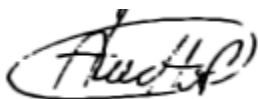
Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



---

Alexandra Hernández Páez

Fecha DD/MM/AAAA

Fecha 31/01/2023

## Agradecimientos

Este trabajo desarrollado en la prestigiosa Universidad Nacional de Colombia es producto del esfuerzo conjunto de muchas personas, en primera instancia quiero agradecer a mis profesores de la maestría, quienes contribuyeron en mi formación académica, profesional y personal; especialmente agradezco a la profesora María Teresa Reguero y el profesor Emiliano Barreto Hernández que me permitieron ingresar a el grupo de investigación, al profesor Emiliano por guiarme, enseñarme, ayudarme y acompañarme en este camino desde su área de conocimiento, siempre presto brindarme sus sugerencias y atención a mis dudas, además, agradezco a mi codirectora, la Dra Aura Lucia Leal. Agradecimientos y augurios de éxitos también a todos mis compañeros de los grupos de investigación de bioinformática y epidemiología molecular especialmente a: Ángela, Sebastián, Diego y Nicole; así mismo, agradezco a los funcionarios del IBUN y al personal de salud del hospital de la ciudad de Bogotá donde se recolectaron las muestras y las historias clínicas por su colaboración para llevar a cabo esta investigación. Agradezco inmensamente a Dios, a la motivación, inspiración y ejemplo más profunda para hacer las cosas bien en la vida que me brindaron en mi educación mis profesores en el trasegar de mi vida académica y mis familiares, especialmente mi padre Gustavo Hernández q.e.p.d, mi madre Oliva Páez a quienes amo y admiro con todo mi corazón, siempre dispuestos a apoyar mis sueños; a mis hermanos que sea motivo de inspiración de no rendirse nunca y superar las adversidades; a mi tía Emilce Páez por su acompañamiento, a mis demás familiares, amigos y conocidos más cercanos por sus palabras valiosas de apoyo en el momento oportuno. Por último, quisiera agradecer también a los familiares de los pacientes, a los mismos pacientes, aquellos que sobrevivieron y los que lamentablemente fallecieron, porque esta investigación es dedicada a ellos desde el fondo de mi corazón, deseando de alguna forma contribuir con la ciencia desde este trabajo y deseando que a futuro a través de otras investigaciones se pueda obtener un tratamiento efectivo contra la problemática de la resistencia antimicrobiana cada día más creciente, bendiciones infinitas para todos



## Resumen

### **Análisis genómico comparativo de aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productores de Carbapenemasas en pacientes con y sin SARS-CoV2 de la ciudad de Bogotá durante el periodo de pandemia**

Durante la pandemia de COVID-19 se detectaron en los pacientes afectados por SARS-CoV-2 *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, lo que conduce a desenlaces fatales y desafíos para la resistencia antimicrobiana. En nuestro estudio, realizado en un hospital durante un periodo de la pandemia, se obtuvo la comparación epidemiológica y genómica de dos grupos de CRKP: 14 y 25, aisladas respectivamente de 10 y 19 pacientes COVID-19 y sin COVID-19; resaltando que las primeras CRKP fueron más resistentes frente a  $\beta$ -lactámicos como cefoxitina, pero menos resistentes frente a trimetoprim/sulfametoxazol y ciprofloxacina que las segundas CRKP. Fueron detectados 75 genes en todos los aislamientos del estudio; se presentaron coproducciones de genes relacionados con carbapenemasas en algunos de los genomas, la Kp082 tenía: *NDM-1*, *KPC-3*, *GES-2*, *OXA-2* una combinación no reportada en *K. pneumoniae*. Se observó la diversidad genética de los dos grupos de aislamientos del estudio, dada por la presencia de variedad de STs y el árbol filogenético basado en los SNPs del core, donde se evidenció que 43,6% de las CRKP pertenecientes a los dos grupos de estudio presentes en el clado IV se asignaron a ST1082. Además, reveló que los pacientes 7, 19 y 8 presentaban aislamientos distribuidos en diferentes clados y como el resistoma presente en las CRKP aun de un mismo clon era variable. Estos hallazgos resaltan la necesidad de dirigir acciones para mejorar continuamente los protocolos de prevención, control de infecciones y programas de administración de antimicrobianos a fin de frenar la expansión de CRKP.

**Palabras clave:** Resistencia antimicrobiana, Carbapenemasas, COVID-19, Clones, *Klebsiella pneumoniae*, Infecciones intrahospitalarias, Secuenciación de genoma completo.

## Abstract

### **Comparative genomic analysis of clinical isolates of Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients with and without SARS-CoV2 in the city of Bogotá during the pandemic period**

During the COVID-19 pandemic, carbapenem-resistant *K. pneumoniae* were detected in SARS-CoV-2-affected patients, leading to fatal outcomes and challenges to antimicrobial resistance. In our study, carried out in a hospital during a period of the pandemic, the epidemiological and genomic comparison of two groups of CRKP was obtained: 14 and 25, isolated respectively from 10 and 19 COVID-19 and non-COVID-19 patients; highlighting that the first CRKPs were more resistant against  $\beta$ -lactams such as ceftazidime, but less resistant against trimethoprim/sulfamethoxazole and ciprofloxacin than the second CRKPs. 75 genes were detected in all the study isolates; co-productions of genes related to carbapenemases were present in some of the genomes, Kp082 had: *NDM-1*, *KPC-3*, *GES-2*, *OXA-2*, a combination not reported in *K. pneumoniae*. The genetic diversity of the two groups of isolates in the study was observed, given the presence of a variety of STs and the phylogenetic tree based on the SNPs of the core, where it was evidenced that 43.6% of the CRKPs belonging to the two groups of study present in clade IV were assigned to ST1082. In addition, it revealed that patients 7, 19 and 8 had isolates distributed in different clades and that the resistome present in the CRKP even from the same clone was variable. These findings highlight the need for targeted actions to continually improve infection prevention, control protocols, and antimicrobial stewardship programs to curb the spread of CRKP.

**Keywords:** Antimicrobial resistance, Carbapenemases, COVID-19, Clusters, *Klebsiella pneumoniae*, nosocomial infections, Whole genome sequencing.



# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XV</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Objetivo General</b> .....	<b>5</b>
1.1 Objetivos específicos .....	5
<b>2. Estado del Arte</b> .....	<b>7</b>
2.1 Coronavirus SARS-CoV-2 .....	7
2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	8
2.3 Mecanismos generales de resistencia a antibióticos presentes en <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	9
2.4 Panorama general de la resistencia a antibióticos en aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes a carbapenémicos .....	11
2.5 Secuenciación del genoma completo (WGS) .....	14
2.6 Coinfecciones de SARS-CoV-2 con <i>K. pneumoniae</i> .....	14
<b>3. Metodología</b> .....	<b>17</b>
3.1 Diseño y criterios de inclusión de aislamientos de CRKP en el estudio .....	17
3.2 Recolección e identificación de los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes a carbapenémicos .....	18
3.3 Transporte y criopreservación de los aislamientos .....	18
3.4 Identificación microbiológica de los aislamientos .....	19
3.5 Extracción del ADN genómico de las <i>K. pneumoniae</i> resistentes a carbapenémicos .....	19
3.6 Secuenciación del ADNg de los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes a carbapenémicos .....	20
3.7 Análisis bioinformático .....	20
3.7.1 Análisis de calidad de los reads .....	21
3.7.2 Ensamblaje y anotación .....	21
3.7.3 Obtención del resistoma .....	21

---

3.7.4	Tipificación de secuencias Multilocus (MLST).....	21
3.7.5	Análisis filogenético .....	22
<b>4.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>23</b>
4.1	Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes y de los aislamientos 23	
4.2	Identificación microbiológica de los aislamientos .....	25
4.3	Perfil fenotípico de susceptibilidad antimicrobiana .....	27
4.4	Extracción de ADN genómico.....	31
4.5	Ensamblaje y Anotación .....	32
4.6	Resistoma de los aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes a carbapenemasas .....	33
4.7	Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST) .....	41
4.8	Análisis Filogenético .....	42
<b>5.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y Recomendaciones .....</b>	<b>61</b>
6.1	Conclusiones .....	61
6.2	Recomendaciones .....	62
	<b>Anexos: Tablas y Figuras .....</b>	<b>63</b>
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>75</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 2-1:</b> Características de la aparición y propagación de MDR y XDR <i>Klebsiella pneumoniae</i> y genes de antibiótico resistencia. ....	13
<b>Figura 4-1:</b> Caracterización microbiológica de <i>K. pneumoniae</i> productoras de carbapenemasas en agar MacConkey y Agar BHI. ....	26
<b>Figura 4-2:</b> Prueba de String test.....	26
<b>Figura 4-3:</b> Identificación bioquímica de <i>K. pneumoniae</i> . ....	27
<b>Figura 4-4:</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN genómico extraído de aislamientos CRKP.....	32
<b>Figura 4-5:</b> Árbol filogenético basado en los SNPs del core de las 39 <i>K. pneumoniae</i> resistentes a carbapenémicos del estudio aisladas tanto de pacientes COVID-19 como de pacientes sin COVID-19.....	43

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 2-1:</b> Principales carbapenemasas presentes en aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> productores de carbapenemasas y sus características. ....	11
<b>Tabla 4-1:</b> Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes.....	24
<b>Tabla 4-2:</b> Tipos de muestras de donde fueron aisladas las CRKP incluidas en el estudio. ....	25
<b>Tabla 4-3:</b> Pruebas fenotípicas de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes a carbapenémicos. ....	28
<b>Tabla 4-4:</b> Comportamiento de resistencia de los aislamientos CRKP del estudio frente a los antibióticos testeados.....	29
<b>Tabla 4-5:</b> Tratamiento antibiótico administrado previamente a los pacientes involucrados en el estudio.....	30
<b>Tabla 4-6:</b> Genes de resistencia asociados a Inactivación de antibióticos $\beta$ -lactámicos presentes en los aislamientos CRKP.....	34
<b>Tabla 4-7:</b> Genes de resistencia asociados a Inactivación de otros antibióticos presentes en los aislamientos CRKP.....	36
<b>Tabla 4-8:</b> Genes de resistencia asociados a bombas de eflujo presentes en los aislamientos de CRKP.....	38
<b>Tabla 4-9:</b> Genes de resistencia asociados a modificación del sitio blanco presentes en los aislamientos CRKP.....	39
<b>Tabla 4-10:</b> Genes de resistencia asociados a permeabilidad reducida presentes en los aislamientos CRKP.....	40
<b>Tabla 4-11:</b> Perfiles alélicos de los MLST obtenidos y su distribución en los grupos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes a carbapenémicos del estudio.....	41

## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Abreviatura Término

<i>ABC</i>	ATP-binding cassette (transportadores ABC de unión a ATP)
<i>AMR</i>	Antimicrobial Resistance (Resistencia antimicrobiana)
<i>ARGs</i>	Antimicrobial Resistant Genes (Genes de antibiótico resistencia)
<i>BLEEs</i>	$\beta$ -lactamasas de espectro extendido
<i>CARD</i>	Base de datos integral de investigación de antibióticos
<i>CDC</i>	Centros para el control y la prevención de enfermedades
<i>CDS</i>	Coding Sequence (región codificadora de un gen)
<i>CLSI</i>	Instituto de estándares de Laboratorio Clínico
<i>CRKP</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a Carbapenémicos
<i>ECDC</i>	Centro Europeo para Prevención y el Control de Enfermedades
<i>EDTA</i>	Ácido etilendiaminotetracético
<i>EPIMOL</i>	Laboratorio de Epidemiología Molecular
<i>HEMO</i>	Hemocultivo
<i>IAAS</i>	Infecciones Asociadas a la Atención en Salud
<i>IBUN</i>	Instituto de Biotecnología (Universidad Nacional de Colombia)
<i>INS</i>	Instituto Nacional de Salud
<i>MDR</i>	Multidrug- Resistant (Multidrogo resistencia)
<i>MFS</i>	Superfamilia del facilitador mayor
<i>MLST</i>	Tipificación de Secuencias Multilocus
<i>NCBI</i>	Centro Nacional de información de Biotecnología
<i>NDM</i>	Nueva Delhi Metalo- $\beta$ -lactamasa
<i>NGS</i>	Secuenciación de Nueva Generación
<i>NK</i>	Natural killer (linfocitos asesinos naturales)
<i>OECD</i>	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
<i>OMS</i>	Organización Mundial de la Salud
<i>OPS</i>	Organización Panamericana de la Salud
<i>PBP</i>	Penicilin Binding Protein (Proteínas fijadoras de penicilina)



**Abreviatura Término**

---

<i>PFGE</i>	Electroforesis en gel de campo pulsado
<i>PCR</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>PROA</i>	Programas de optimización de antimicrobianos
<i>RAM</i>	Resistencia a los antimicrobianos
<i>RGI</i>	Identificador de genes de resistencia
<i>RND</i>	Familia de resistencia a división por nodulación
<i>rRNA</i>	RNA ribosomal
<i>SIM</i>	Sulfuro Indol movilidad
<i>SMR</i>	Familia de resistencia pequeña a multifármacos
<i>SNPs</i>	Polimorfismos de nucleótido único
<i>SOT</i>	Secreción orotraqueal
<i>TBE</i>	Tris Borato EDTA
<i>tRNA</i>	RNA de transferencia
<i>UCI</i>	Unidad de cuidados intensivos
<i>URO</i>	Urocultivo
<i>WGS</i>	Whole genome sequencing (Secuenciación de genoma completo)



# Introducción

Muchas enfermedades han sido catalogados a lo largo de la historia como amenazas tales como el ébola, zika, dengue, chikungunya e influenza entre otras; gracias a las estrategias de salud pública, al desarrollo y administración de medicamentos o vacunas, estas enfermedades se han logrado controlar y erradicar.

Motivo de preocupación actual, son patógenos como el SARS-CoV-2, que a corte del 09 de Agosto del 2022, había causado un número de muertes reportadas a nivel mundial de 6.416.023 (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2022). Mientras que en Colombia, para el 04 de Agosto del 2022, este virus daba cuenta de unas 141.075 personas fallecidas, siendo Bogotá D.C donde se presentaron más casos y la ocupación más alta en UCI (Instituto Nacional de Salud [INS], 2022).

Las *Enterobacterias* multirresistentes productoras de carbapenemasas como *K. pneumoniae*, causantes de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), requieren de acciones urgentes como la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos para evitar su expansión, por lo que han sido clasificadas dentro de una prioridad crítica (OMS, 2017).

Según los Centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC, 2019) para el año 2017, estas bacterias dan cuenta de una alta mortalidad en los pacientes, así como de los altos costos de la atención intrahospitalaria en salud derivado de la problemática de la resistencia antimicrobiana (AMR). Algunos autores plantean que quizás alrededor de 2,4 millones de personas podrían morir (Organización para la cooperación y el desarrollo económicos [OECD], 2018).

En Colombia, según el informe más reciente realizado por el Instituto Nacional de Salud (INS, 2019), en muestras de *Enterobacterias* procedentes de los laboratorios de salud pública del país se detectaron 1375 *Enterobacterias* productoras de las carbapenemasas,

siendo las de tipo KPC y NDM las más frecuentemente encontradas, seguidas de VIM, GES, IMP y OXA-48 en orden respectivo de prevalencia; además, se reportó la coproducción de carbapenemasas en 86 de estas *Enterobacterias*; lo cual evidencia la necesidad de la detección oportuna de estos microorganismos con el fin instaurar un tratamiento efectivo en los pacientes teniendo en cuenta los programas de administración de antimicrobianos (Cantón et al., 2020).

Estudios a nivel mundial y en Colombia han contribuido de manera eficaz a una mejor comprensión y caracterización clínica, epidemiológica y genómica de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasas (CRKP) a nivel intrahospitalario. En el marco de la actual pandemia, se ha documentado la presencia de coinfección de diferentes microorganismos como virus, hongos y bacterias en pacientes con COVID-19; es así como el 91,8% de los pacientes hospitalizados infectados con SARS-CoV-2, la mayoría de ellos en estado crítico, también lo están con bacterias como *Klebsiella pneumoniae* (X. Zhu et al., 2020).

Estudios basados en secuenciación de genoma completo (WGS) realizados durante la pandemia evidencian la detección de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas KPC y OXA-48 en Italia (Arcari et al., 2021); así como de bacterias como estas productoras de carbapenemasas NDM-1, causantes de un brote en una unidad de cuidados intensivos (UCI), en Francia en pacientes con COVID-19 (Amarsy et al., 2021).

Según se ha documentado, el período de pandemia, fue un período propicio para la propagación de las CRKP con distintas características epidemiológicas, moleculares y de resistencia. Es así como en Australia entre septiembre del 2021 a octubre del 2021 (Howard-Jones et al., 2022) y en Francia durante el tercer pico de la pandemia entre marzo y mayo del 2021 (Amarsy et al., 2021) se observaron relaciones clonales entre CRKP aisladas de pacientes COVID-19 y CRKP aisladas del medio ambiente mediante la utilización de los SNPs del core.

Por lo tanto, es importante mejorar la capacidad de respuesta intrahospitalaria durante la pandemia, se hace necesario el uso de herramientas diagnósticas oportunas de epidemiología molecular como WGS, que permitan obtener el genoma completo de los aislamientos clínicos circulantes como *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos y

realizar estudios genómicos comparativos, con el fin de que se tomen las medidas respectivas de mejora continua que puedan mitigar la probabilidad de colonización o infección por CRKP en pacientes sin COVID-19, así como la aparición de coinfecciones o infecciones secundarias causadas por CRKP en pacientes COVID-19.

Dado lo anteriormente expuesto y los limitados estudios en Latinoamérica acerca de las infecciones o coinfecciones señaladas previamente e incluso de estudios genómicos comparativos de CRKP circulantes durante la pandemia, el presente estudio permite comparar los diversos factores epidemiológicos y clínicos, además, el resistoma y las relaciones genómicas presentes en *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos aisladas de pacientes con y sin COVID19 recolectadas durante el período de pandemia, comprendido entre el 11 de Marzo de 2020 y el 12 de Julio del 2021, en un hospital de Bogotá D.C.



# 1. Objetivo General

Comparar el Genoma presente en los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos presentes en pacientes con diagnóstico de COVID-19 con el Genoma de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos en pacientes sin COVID-19 obtenidos durante el periodo de la pandemia en un Hospital de Bogotá.

## 1.1 Objetivos específicos

1. Caracterizar fenotípicamente cada uno de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos que se aislen en pacientes con y sin diagnóstico de COVID-19.
2. Secuenciar los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos encontrados en pacientes con y sin diagnóstico de COVID-19.
3. Describir los elementos genéticos de resistencia presentes en los genomas de los aislamientos secuenciados previamente.
4. Identificar la variación de los elementos genéticos como el pangenoma y el resistoma de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos aislados en pacientes coinfectados con SARS-CoV-2 con respecto a cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos aisladas en pacientes sin esta coinfección





## 2.Estado del Arte

### 2.1 Coronavirus SARS-CoV-2

Los orígenes del SARS-CoV-2 han sido relacionados a diciembre de 2019, con localización geográfica en la provincia de Wuhan, China (N. Zhu et al., 2020). Este es un virus perteneciente a la familia de los  $\beta$ -coronavirus, que posee ARN monocatenario de sentido positivo, causante de la enfermedad llamada COVID-19. Se trata de una neumonía que afecta a los pacientes de una manera crítica y es de fácil trasmisión (Guo et al., 2020), cuya declaración oficial de pandemia, fue dada el 11 de Marzo del 2020 (*World Health Organization, 2020*).

La enfermedad se puede manifestar en pacientes con cuadros asintomáticos leves, moderados, severos o críticos (X. Zhu et al., 2020); factores como la edad avanzada, el sexo, las comorbilidades como los problemas cardiacos, la hipertensión, la diabetes, enfermedades renales y enfermedades respiratorias se relacionan con la mortalidad de los pacientes por COVID-19 (Sepandi et al., 2020).

Derivado de la infección por SARS-CoV-2 se pueden presentar una serie de complicaciones graves que comprometen el estado clínico del paciente y que podrían conllevar al aumento de las tasas de mortalidad; es así como la producción de citoquinas y otros mediadores inmunológicos son factores claves que se producen en respuesta a la infección vírica, conduciendo a la instauración de una respuesta inflamatoria generalizada en el huésped (Huang et al., 2020).

Además, el tropismo del virus, lo hacen propenso a afectar otros órganos y sistemas, lo que conduce al establecimiento de una falla multiorgánica, acompañada en ocasiones de alteraciones en los valores de las pruebas de la coagulación como el Dímero-D y el tiempo de protrombina (Huang et al., 2020; Guo et al., 2020).

## 2.2 *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un bacilo que no presenta flagelos, por lo tanto carece de movilidad. Es un bacilo gramnegativo, el cual además, fermenta lactosa lo que se puede evidenciar por la presencia de colonias rosa en el agar MacConkey. Dentro de sus características fenotípicas se destaca que en los medios de cultivo, los aislamientos poseen un crecimiento de apariencia mucosa, debido a la producción de la cápsula, la cual es codificada en el locus síntesis de polisacárido capsular (cps), que junto con el lipopolisacárido le confieren a la bacteria la propiedad de evadir la respuesta inmune mediada por fagocitosis (Samanta & Bandyopadhyay, 2020; Martin & Bachman, 2018).

Estudios bioinformáticos derivados de WGS han demostrado que esta bacteria comprende tanto un genoma central como de uno accesorio, este último, asociado a la presencia de elementos genéticos móviles, donde se albergan muchos de los genes responsables de los mecanismos de virulencia y resistencia a antibióticos (Holt et al., 2015, Martin & Bachman, 2018). La virulencia y la resistencia permiten clasificar a *Klebsiella pneumoniae* en cepas de tipo nosocomial y comunitario, según el ambiente donde se adquieren y las enfermedades que generan. Las cepas nosocomiales también conocidas como (cKP) son más resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en comparación con las cepas hipervirulentas (hvKP) (Wu et al., 2017).

Los mecanismos de virulencia y resistencia en esta bacteria, le confieren la habilidad para sobrevivir en diversos ambientes y colonizar las superficies mucosas de los animales, pero también de los seres humanos sanos, haciendo parte de su microbiota en sitios como el tracto gastrointestinal, la piel, la nariz, la garganta, lo que hace de este microorganismo uno de los principales causantes de enfermedades intrahospitalarias oportunistas tales como sepsis, infecciones urinarias, del tracto respiratorio, infecciones de heridas en pacientes con enfermedades de base o inmunocomprometidos (Holt et al., 2015; Martin & Bachman, 2018).

## 2.3 Mecanismos generales de resistencia a antibióticos presentes en *Klebsiella pneumoniae*

Las bacterias han desarrollado a través de su evolución distintos mecanismos de adaptación para sobrevivir tales como la producción de mecanismos de resistencia a antibióticos como la inactivación de antibióticos, permeabilidad reducida a antibióticos dada por porinas, bombas de eflujo, alteración o modificación del sitio blanco que dotan a la bacteria de la capacidad de resistencia no solo a  $\beta$ -lactámicos sino a diversas otras clases de antibióticos (Navon-Venezia et al., 2017; Suárez & Gudíol, 2009).

El primer mecanismo y el más conocido implicado en la resistencia a antibióticos en *K. pneumoniae* es la inactivación de antibióticos dada por la producción de enzimas modificadoras de antibióticos, dentro de las cuales las más conocidas son las  $\beta$ -lactamasas que se encargan de hidrolizar un anillo  $\beta$ -lactámico, que poseen dentro de su estructura principal una clase de antibióticos denominados  $\beta$ -lactámicos, con el propósito de impedir su función (Suárez & Gudíol, 2009).

Es de resaltar, que dentro de las  $\beta$ -lactamasas, hay una clasificación denominada carbapenemasas, enzimas que poseen un espectro de actividad ampliado capaces de hidrolizar los antibióticos denominados carbapenémicos; existen 3 clases de estas enzimas según la clasificación propuesta en sus inicios por Ambler: la clase A donde se encuentran las serincarbapenemasas como KPC; la clase B o también denominadas metalo- $\beta$ -lactamasas que comprenden las NDM-1, VIM-1 y IMP-1 y la clase D u oxacilinasas, dentro de la cual las enzimas OXA-48 y OXA-23 son las más representativas (Wilson & Török, 2018; Pitout et al., 2015; Bush & Jacoby, 2010).

Además, dentro del mecanismo de inactivación de antibiótico, existen otras enzimas que tienen funciones de acetilación, adenilación, fosforilación e incluso metilación involucradas en la resistencia a otros antibióticos como los aminoglucósidos en *K. pneumoniae*; Es así, como se conoce de el gen *AAC(6')-Ib-cr* relacionado con la producción de una enzima que media acetilación y que produce resistencia no solo a aminoglucósidos sino también a quinolonas (Navon-Venezia et al., 2017).

El segundo mecanismo de resistencia está relacionado con la permeabilidad disminuida de la membrana externa y con ello la disminución en la absorción del antibiótico  $\beta$ -lactámico hacia al espacio periplásmico, mediado principalmente por porinas; en *K. pneumoniae* la mutación de los genes que codifican las porinas, la sobreproducción de ellas o la eliminación de las mismas entre otros son los mecanismos de los que se valen estas bacterias para evitar la acción de los antibióticos (Suárez & Gudiol, 2009); además, existen otras porinas en este microorganismo que causan resistencia a varias clases de antibióticos, KpnO es un ejemplo de ello, e una porina conocida, que causa resistencia frente a aminoglucósidos (Navon-Venezia et al., 2017).

Por otra parte, el tercer mecanismo de resistencia a antibióticos está relacionado con la presencia de bombas de eflujo, las cuales permiten expulsar los antibióticos  $\beta$ -lactámicos hacia el exterior de la bacteria (Suárez & Gudiol, 2009); También, se ha encontrado resistencia hacia los aminoglucósidos en *K. pneumoniae* relacionada con la presencia de bombas de flujo conocidas tales como: AcrAB-TolC y KpnE, KpnF; similar, se han encontrado la resistencia hacia quinolonas mediada por bombas de eflujo como OqxAB (Navon-Venezia et al., 2017).

Por último, el mecanismo de modificación o alteración en el sitio blanco es causante de la resistencia frente a  $\beta$ -lactámicos de algún modo mediante la producción en la bacteria de mutaciones en los genes que codifican las dianas farmacológicas de estos antibióticos, las denominadas proteínas fijadoras de penicilinas (PBP), a fin de evitar que los  $\beta$ -lactámicos alcancen estas diana farmacológicas y eventualmente degraden la pared celular bacteriana (Suárez & Gudiol, 2009). Este mecanismo además, está asociado con la resistencia a las quinolonas en *K. pneumoniae* mediado por la modificación de las subunidades *gyr A* y *gyr B* de la ADN girasa y las subunidades *par C* y *par E* de la topoisomerasa IV, al igual que por la producción de genes *qnr* (Navon-Venezia et al., 2017).

## 2.4 Panorama general de la resistencia a antibióticos en aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos

*Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos es un patógeno ampliamente distribuido a nivel mundial (Tabla 2-1), que según la epidemiología molecular los tipos más frecuentes son distintas variantes de KPC, OXA, NDM, IMP y VIM, las cuáles se diseminan gracias a elementos genéticos móviles como los integrones, especialmente los de clase I; los plásmidos como IncA/C,N, IncFII, IncL/M y los transposones como Tn4401, Tn1999 (Lomonaco et al., 2018; Pitout et al., 2015).

**Tabla 2-1:** Principales carbapenemasas presentes en aislamientos de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas y sus características.

Tipo de enzimas (clase) y ejemplos	Espectro de actividad	Inhibidores	Áreas de endemicidad	Epidemiología molecular
<b>MBLs(B): NDM-1, IMP, VIM</b>	Penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenémicos	Quelantes de metal ejemplo: EDTA, ácido dipicolínico	Japón (IMP), Taiwán (IMP), subcontinente Indio (NDM), Estados Balcánicos (NDM), Grecia (VIM)	Plásmidos IncA/C,N (NDM), integrones de clase I (VIM, IMP)
<b>KPCs(A): KPC-2,-3, otras</b>	Penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenémicos	Ácido clavulánico (débil), tazobactam (débil), ácido borónico, aviabactam	Estados Unidos, Grecia, Italia, Israel, China, Brasil, Colombia, Argentina	Tn4401, IncFII, plásmidos, CC258
<b>OXA-β-lactamasas (D): OXA-48,OXA-181, OXA-204, OXA-232</b>	Penicilinas, temocilina, combinaciones de inhibidor de β-lactamasa, carbapenémicos (débil)	NaCl	Turquía, Norte de África (Marruecos, Túnez), Europa (España, Bélgica)	Tn1999, plásmidos IncL/M

Tomado y modificado de (Pitout et al., 2015)

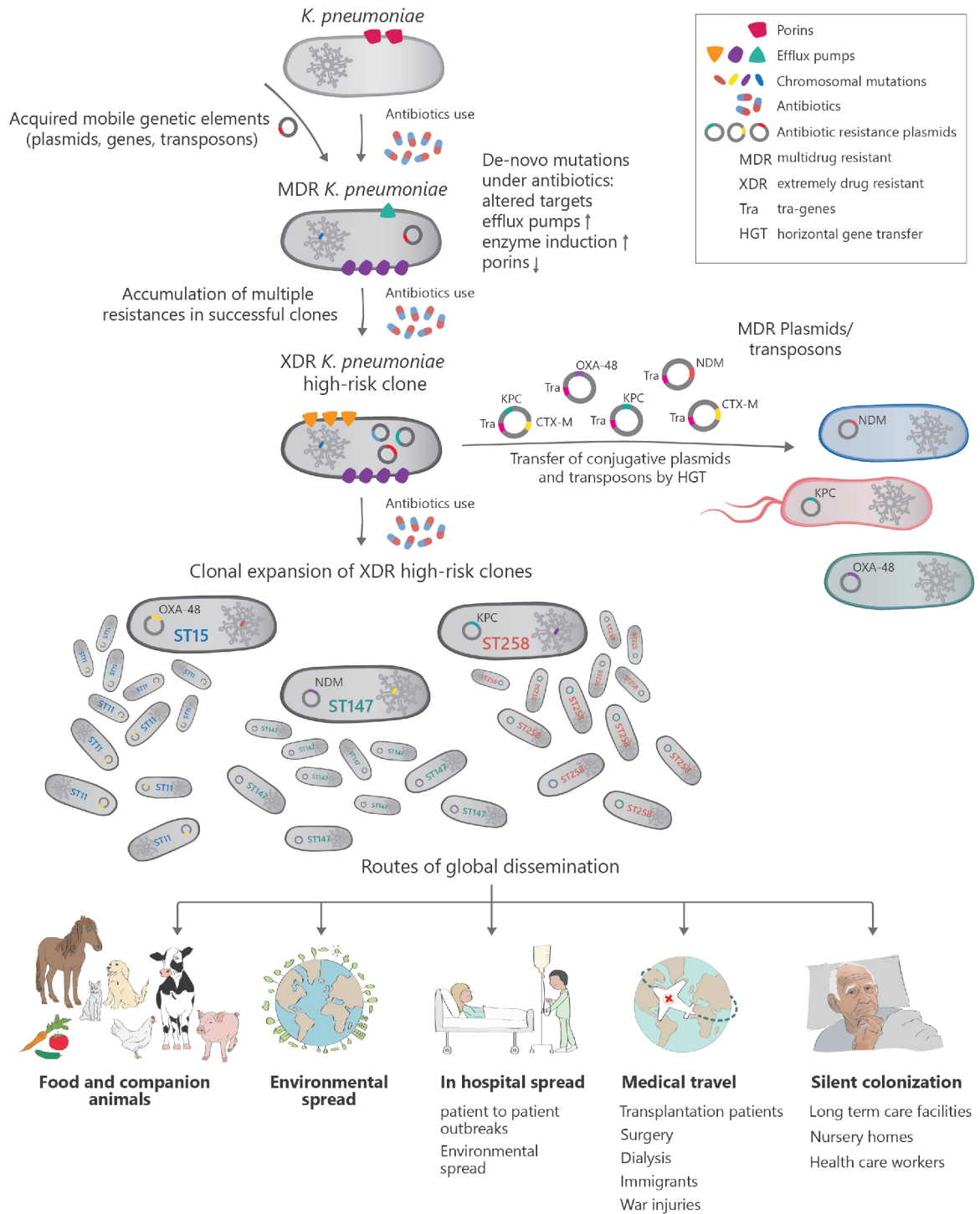
En el año 2017 un reporte indicó que de 117 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, la mayoría 96.8%, eran portadoras del gen *KPC* (Remolina Granados y Escobar Castaño, 2017), de hecho Colombia es endémico en *KPC*, a pesar de que se han reportado otros genes asociados a la producción de varias carbapenemasas tales como: *NDM-1*, *NDM-9*, *VIM-2*, *VIM-4* y *VIM-24* presentes en *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (Saavedra et al., 2021).

La circulación intrahospitalaria de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos con características genómicas como las descritas está relacionada al aumento de los perfiles de resistencia a los antibióticos; en Europa para 2018 la resistencia de *K. pneumoniae* a cefalosporinas de tercera generación fue de un 31,7%, mientras que para los carbapenémicos fue de un 7,5 %, siendo en Grecia donde se presentaba el mayor grado de resistencia a carbapenémicos (Centro Europeo para Prevención y el Control de Enfermedades [ECDC], 2018). En Colombia según el informe más reciente del INS la tasa de resistencia de *K. pneumoniae* a carbapenémicos en el servicio UCI que se reportó fue de un 15,6% (INS, 2019).

En la (Figura 2-1) se esquematiza como *K. pneumoniae* acumulan genes asociados a los cuatro mecanismos de resistencia antibióticos relacionados con la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y carbapenemasas. A su vez se observa que estas *K. pneumoniae* se clasifican en grupos denominados clones de expansión de alto riesgo según la caracterización molecular por Tipificación de secuencias multilocus (MLST). Se ha reportado que el grupo clonal CG258 al que pertenecen los secuencia tipos ST258, ST11 y ST512 es el causante de la mayoría de brotes causados por este microorganismo (Navon-Venezia et al., 2017).

Existen muchos otros STs que en su mayoría se han descrito Internacionalmente en *K. pneumoniae* a parte de los mencionados previamente como ST147, ST14, ST101, ST307 y ST15 (Lomonaco et al., 2018; Navon-Venezia et al., 2017). En Colombia se han reportado CRKP pertenecientes a diversos complejos clonales como CG258, CG147, CG152, CG14/15, CG307, CG17/CG20, CG13, CG76, CG39, CG45, CG70 y CG25, cada uno de los cuales agrupan sus propios linajes de STs (Saavedra et al., 2021).

**Figura 2-1:** Características de la aparición y propagación de MDR y XDR *Klebsiella pneumoniae* y genes de antibiótico resistencia.



Tomado de (Navon-Venezia et al., 2017)

Es de resaltar que el entorno clínico propicia la diseminación de diferentes complejos clonales como los mencionados, pero también, son muy importantes otras rutas como las condiciones medioambientales (Navon-Venezia et al., 2017), es así como por ejemplo se conoce de la diseminación de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* portadoras de el gen *KPC* en aguas residuales de los hospitales (Meir-Gruber et al., 2016), lo cual es importante a nivel de salud pública, pues se convierten microorganismos de fácil adquisición y de fácil transmisión en la comunidad.

## 2.5 Secuenciación del genoma completo (WGS)

Los ensayos de rutina en los laboratorios de microbiología para la identificación y la obtención de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos bacterianos requieren de tiempo y esfuerzo. Se ha demostrado que hay concordancia entre los datos genómicos de *K. pneumoniae* aportados por los análisis basados en los estudios de WGS y la susceptibilidad fenotípica determinada rutinariamente en los laboratorios (Shelburne et al., 2017).

Actualmente, los métodos de secuenciación de nueva generación son capaces de producir muchas secuencias con bastante rapidez y a bajo costo asequibles para la comunidad científica que trabaja a nivel genómico y molecular con microorganismos, haciendo que la WGS junto con las herramientas bioinformáticas posibiliten la detección del resistoma, los elementos genéticos móviles, el viruloma, así como la realización de estudios de genómica comparativa, facilitando el seguimiento epidemiológico de precisión de aislamientos multirresistentes como *Klebsiella pneumoniae* causantes de brotes intrahospitalarios (Hernández et al., 2020).

## 2.6 Coinfecciones de SARS-CoV-2 con *K. pneumoniae*

Se ha documentado que enfermedades causadas por virus como SARS-CoV, MERS-CoV y el AH1N1 están relacionadas con la aparición de coinfecciones e infecciones secundarias con otros patógenos como bacterias (Manohar et al., 2020; Hoque et al., 2021). Es así como durante el brote del virus de influenza A (H1N1) hacia el año 2009 se encontraron coinfecciones con bacterias como *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* (Dhanao et al., 2011).



Estudios realizados durante pandemia en todo el mundo reportan el aumento de las coinfecciones con *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas en pacientes COVID-19 (Amarsy et al., 2021; Gomez-Simmonds et al., 2020; García-Meniño et al., 2021; Arteaga-Livias et al., 2022). La incidencia de *Klebsiella pneumoniae* KPC en pacientes COVID-19 aumentó durante un período de pandemia comprendido entre marzo a abril del 2020 en Italia (Tiri et al., 2020). En Colombia un estudio realizado en pacientes con diagnóstico de COVID-19 durante el año 2020 encontró que la prevalencia de sobreinfección bacteriana en pacientes con COVID-19 fue de 49,6%, estando *K. pneumoniae* dentro de los microorganismos más frecuentemente encontrados (Cataño-Correa et al., 2021).

Se ha visto como las tasas de morbilidad y mortalidad fueron altas en los pacientes con coinfecciones durante la pandemia (Manohar et al., 2020; Mędrzycka-Dabrowska et al., 2021; Hoque et al., 2021; X. Zhu et al., 2020), esto se podría relacionar a factores causales posibles como fisiopatología del virus, factores de riesgo propios del hospedero y medioambientales.

El establecimiento de la infección por SARS-CoV-2 conduce al daño del tracto respiratorio alterando la secreción de moco, la función ciliar y el intercambio gaseoso; además, se ha visto como el virus deprime el sistema inmunológico al propiciar el daño de los linfocitos B y T, Natural Killer (NK) y a la producción de citoquinas (Manohar et al., 2020; Hoque et al., 2021); así como también, el virus causa que la microbiota comensal del tracto gastrointestinal disminuya, de esta manera es probable que la infección viral acelere el proceso de colonización y establecimiento de infecciones secundarias por *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos que son oportunistas (Hoque et al., 2021).

Por otra parte, son los pacientes COVID-19 con estancia prolongada en UCI, con otros factores de riesgo como comorbilidades, edad avanzada, en tratamiento con medicamentos como antibióticos, inmunomoduladores y con tratamientos invasivos, quienes adquieren fácilmente estas coinfecciones (Sepandi et al., 2020; Huang et al., 2020; Manohar et al., 2020; Hoque et al., 2021; Cataño-Correa et al., 2021).

Algunos investigadores han indicado que el uso incorrecto de los protocolos de prevención y control de infecciones y la falla de los programas de administración de antibióticos

utilizados ampliamente de manera preventiva y como tratamiento, pueden ser otras de las posibles causas del surgimiento de las coinfecciones durante la pandemia (Arteaga-Livias et al., 2022; Cataño-Correa et al., 2021; Howard-Jones et al., 2022; Amarsy et al., 2021; Manohar et al., 2020; Nori et al., 2020).

## **3. Metodología**

### **3.1 Diseño y criterios de inclusión de aislamientos de CRKP en el estudio**

Este es un estudio de corte trasversal, a partir del cual se seleccionaron aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (CRKP) de 29 pacientes, los cuales ingresaron entre el 02 de enero del 2020 y el 10 de julio del 2021, en un hospital de tercer nivel de la ciudad de Bogotá D.C. Los pacientes correspondían a dos grupos, un grupo conformado por pacientes que hubieran ingresado al hospital con diagnóstico clínico de COVID-19 y/o con una prueba de PCR o Ag positivo para SARS-CoV-2 o que hubieran desarrollado esta enfermedad de manera intrahospitalaria posterior a su admisión; mientras que el otro grupo comprendía aquellos pacientes negativos para COVID-19 desde el ingreso y hasta la recolección del aislamiento.

Se tuvieron en cuenta aspectos sociodemográficos y clínicos de los pacientes como: la edad, género, desenlace; las fechas de ingreso al hospital del paciente, de realización de las pruebas diagnósticas y de aislamiento de las *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (CRKP); además, del tipo de muestra de la que se obtuvieron estos aislamientos, el servicio donde se encontraba el paciente al momento de la recolección de la muestra, así como los antibióticos previos administrados a la infección por CRKP, datos que fueron obtenidos a través de las historias clínicas.

También se obtuvo la firma del consentimiento informado para cada paciente. Es de resaltar que este estudio se encontraba dentro del macroproyecto denominado: diagnóstico molecular de resistencia y virulencia y seguimiento epidemiológico de bacterias Gramnegativas multirresistentes causantes de IAAS basado en secuenciación del genoma completo (WGS) y datos sociodemográficos y clínicos. Proyecto financiado por Colciencias (Convocatoria 896-2018 "Invitación para presentar proyectos de CTEI en

Salud) proyecto código 110189666234, contrato 737-2018 y fue aprobado por el comité de ética del hospital según acta: CEI-comp-2019-09-03.

### **3.2 Recolección e identificación de los aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos**

Se recolectaron y seleccionaron en el laboratorio del hospital, durante un período de la pandemia por COVID-19, comprendido entre el 11 de marzo de 2020 y el 12 de julio del 2021, 39 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas (CRKP) que provenían de los cultivos de muestras de 29 pacientes. Los 29 aislamientos correspondían a 14 CRKP aisladas de pacientes COVID-19 y 25 CRKP de pacientes sin COVID-19.

Los aislamientos fueron identificados en el laboratorio del hospital y allí les fueron realizadas las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para detectar las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs), a través de la utilización del equipo automatizado Phoenix™ 100 (BD, Becton-Dickinson USA), acorde con las guías del Instituto de estándares de Laboratorio Clínico (CLSI, 2020). Únicamente algunos aislamientos contaban con las respectivas pruebas confirmatorias fenotípicas de resistencia a carbapenemasas como la prueba de inactivación de carbapenémicos modificado, prueba de EDTA, prueba de ácido borónico y /o Carba NP test; acorde con las directrices de los estándares del CLSI mencionados, todos los aislamientos debían ser resistentes fenotípicamente a uno o varios de los antibióticos carbapenémicos testeados como imipenem, meropem y ertaenem.

Solo se tuvieron en cuenta los antibióticos testeados en todos los aislamientos para realizar los análisis de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana y el cálculo de las tasas de resistencia. En el laboratorio del hospital no fueron testeados todos los antibióticos en todos los aislamientos, porque eso dependía de los protocolos establecidos por los comités de infecciones, el sitio de infección, así como las directrices del CLSI.

### **3.3 Transporte y criopreservación de los aislamientos**

Los aislamientos fueron transportados desde el hospital al laboratorio de epidemiología molecular (EPIMOL) ubicado en el IBUN (Instituto de Biotecnología) de la Universidad Nacional de Colombia en medio de transporte Cary Blair (Thermo Scientific™ Oxoid™,

2020); fueron recuperados y aislados en un medio BHI, incubados por 24 horas a temperatura de 37°C, con el objetivo de obtener un cultivo puro del microorganismo que posteriormente se inoculó en crioviales previamente preparados de medio Skim Milk (Thermo Scientific™ Oxoid™, 2020), los cuales fueron criopreservados a -80°C en el ultracongelador perteneciente al Laboratorio EPIMOL.

### **3.4 Identificación microbiológica de los aislamientos**

Los aislamientos pertenecientes a *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos fueron sembrados en agar BHI (Thermo Scientific™ Oxoid™, 2020) y MacConkey (Thermo Scientific™ Oxoid™, 2020) para su aislamiento y posterior identificación en el laboratorio EPIMOL. A partir del medio BHI se realizó la prueba de cuerda String test (Shon et al., 2013) según la cual las colonias con producción de hiper mucoviscosidad son aquellas que forman una cuerda viscosa de más de 5 mm de largo, característica indicativa de aislamientos de *K. pneumoniae* hipervirulentas; posteriormente a partir de los aislamientos puros obtenidos en el medio BHI se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: TSI, Citrato de Simmons, SIM (Sulfuro, indol, Motilidad) y urea para la confirmación de los aislamientos CRKP (Thermo Scientific™ Oxoid™, 2020).

### **3.5 Extracción del ADN genómico de las *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos**

Para la realización de este paso se tomó 1 colonia de cada aislamiento de *K. pneumoniae* y se inoculó en un tubo que contenía 5 ml de caldo BHI, dejándose en overnight con agitación constante a 200 rpm y una temperatura de 37°C aproximadamente, por 16-18 horas. Posteriormente, 4ml del contenido de cada tubo fueron pasados a 2 tubos falcon, 2ml por cada tubo, los cuales fueron centrifugados a 14000 rpm por 5 minutos a una temperatura de 4°C, para obtener el pellet de cada *K. pneumoniae* que inmediatamente se procesó con el kit de la casa comercial Invitrogen, PureLink® Genomic DNA Mini Kit, siguiendo las especificaciones del inserto (Invitrogen, 2020).

La cuantificación en ng/ml del DNA extraído se llevó a cabo fluorométricamente con el equipo Qubit 2.0 (Thermo Fisher scientific); mientras que el espectrofotómetro Nanodrop ND-2000C (Thermo Fisher scientific) permitió la evaluación de la calidad y pureza del ADN a través del análisis de las relaciones de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm.

Por último, previo a la preparación de las librerías se llevó a cabo la evaluación de la integridad del ADN mediante un corrido electroforético en condiciones de 84 V por 40 min, tanto del ADNg de los aislamientos de *K. pneumoniae*, como del marcador de peso HyperLadder™ 1 kb Plus (Bioline), en gel de agarosa al 1%, la cual fue preparada previamente en un buffer TBE (Tris Borato EDTA) de concentración 0,5X. La visualización de las bandas marcadas con SYBER safe, se realizó en el fotocomentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (BIO-RAD) haciendo uso del programa Image Lab 6.0.

### **3.6 Secuenciación del ADNg de los aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos**

Una vez verificada la calidad e integridad del ADNg de cada uno de los aislamientos, se realizó la preparación de librerías de secuenciación mediante la utilización del kit Nextera Flex DNA Library Prep y Nextera Flex Index Kit (24 Indices), siguiendo las especificaciones del fabricante (Illumina, 2020).

Por su parte concentraciones de las librerías se obtuvieron utilizando el equipo Qubit 2.0 y el tamaño promedio de las mismas, utilizando el analizador de fragmentos Bioptic Qsep 100 (Bioptic, 2020) datos con los cuales se realizó el pool de secuenciación con todas las librerías, su desnaturalización y la posterior secuenciación, utilizando MiSeq Reagent Kit v3 (600 ciclos) y el secuenciador Illumina MiSeq, siguiendo las indicaciones del fabricante (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) .

### **3.7 Análisis bioinformático**

Se desarrolló a través de la ejecución de un pipeline diseñado por el grupo de bioinformática del IBUN, que involucra una serie de pasos y programas bioinformáticos que se mencionan a continuación; posterior a esos análisis se llevó a cabo el análisis del resistoma, la Tipificación de Secuencias Multilocus y la construcción de un árbol filogenético basado en los core SNPs del genoma de las CRKP.

### 3.7.1 Análisis de calidad de los reads

Se realizó una evaluación de la calidad de los reads utilizando las métricas proporcionadas por el programa FastQC v0.11.7 (Andrews, 2013), mientras que para el posterior filtrado y recorte o eliminación de las secuencias identificadas como de baja calidad y de los adaptadores, se utilizó la herramienta Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014).

### 3.7.2 Ensamblaje y anotación

Los reads secuenciados y procesados anteriormente de los 39 aislamientos de *K. pneumoniae* fueron ensamblados de novo mediante la utilización del programa SPAdes v3.10.1 (Bankevich et al., 2012), el cual hizo uso de los k-mers 127, 99, 21, 33, 55, 77; para posteriormente realizar un análisis de calidad de los genomas ensamblados mediante el programa QUAST (Gurevich et al., 2013).

El proceso de anotación por su parte, se realizó mediante el programa Prokka v1.13 (Seemann, 2014).

### 3.7.3 Obtención del resistoma

Para obtener los genes de resistencia presentes en cada uno de los 39 aislamientos de CRKP, se llevó a cabo un análisis de los contigs obtenidos con la herramienta RGI v5.1.1 que utiliza la base de datos especializada CARD (Alcock et al., 2020). La herramienta RGI generó por cada aislamiento 3 archivos .txt con información relevante acerca del resistoma de las CRKP y de los datos asociados a la corrida del programa. De cada resistoma sólo se tuvieron en cuenta los genes que fueron clasificados por RGI como Strict y Perfect, con los que se creó una tabla de presencia ausencia de los genes de resistencia, donde se incluyeron todos los aislamientos y todos genes asociados a los diferentes mecanismos de resistencia detectados generando una matriz.

### 3.7.4 Tipificación de secuencias Multilocus (MLST)

Para realizar la tipificación de los aislamientos CRKP en los Secuencia tipos (ST) se realizó el análisis del perfil alélico de 7 housekeeping genes: *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* y *tonB*, mediante la búsqueda de ST en la base de datos PubMLST (PubMLST, 2022), de la

cual hace uso la herramienta bioinformática MLST (T.Seemann, 2022a), a partir de los contigs ensamblados de cada uno de los genomas de las CRKP en estudio.

### 3.7.5 Análisis filogenético

Los árboles filogenéticos fueron realizados utilizando el programa Snippy-core (T.Seemann, 2022b), que encuentra los SNPs de cada uno de los 39 genomas de las CRKP con relación al genoma de referencia de *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286*, secuencia de referencia en NCBI: NC\_016845. En el proceso el programa genera los respectivos archivos .bam a partir de los cuales hace un llamado de variantes o polimorfismos de nucleótido único (SNPs), con los que se calcula una matriz de distancia de SNPs que posteriormente se usa para construir el árbol filogenético basado en el algoritmo de máxima verosimilitud con el programa RAxML (Stamatakis, 2014).

El archivo generado fue modificado mediante la adición de los metadatos tales como el número del paciente al que pertenece cada aislamiento, los MLST, La fecha de aislamiento de cada una de las CRKP y el resistoma completo. La visualización del árbol y los metadatos se hizo mediante la herramienta Web iTOL v6 (Letunic & Bork, 2021).



## 4. Resultados

### 4.1 Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes y de los aislamientos

Durante el periodo de pandemia comprendido entre el 11 de marzo de 2020 y el 12 de julio del 2021 en un hospital de Bogotá D.C se obtuvieron 39 aislamientos que dieron positivos para *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas (CRKP), 14 (35,9%) obtenidos de pacientes COVID-19 y 25 (64,1%) sin COVID-19. Los aislamientos provenían de 29 pacientes, 10 (34%) de los cuales eran del grupo COVID-19 y los restantes 19 (66%) del grupo sin COVID-19 (Anexo 1). Del 24,1% de los pacientes del estudio se obtuvieron entre 2 y 3 aislamientos CRKP, correspondientes a los pacientes identificados como 2, 7, 14 y 19 sin COVID-19 ; y 8, 15 y 17 con COVID-19 (Anexo 1).

En cuanto a las características de los pacientes incluidos en el estudio (Tabla 4-1) (Anexo 1), se pudo observar que en lo que se refiere al género, que había una mayor proporción de pacientes COVID-19 pertenecientes al sexo masculino (70%); mientras que en los pacientes sin COVID-19, los de sexo femenino (53%) tuvieron una ligera diferencia con respecto a los de sexo masculino (47%).

En cuanto a la edad, la población total del estudio más representativa eran los mayores de 60 años (62%). Es de destacar que se evidenció una diferencia en el rango de edades entre los dos grupos en estudio, mientras los pacientes sin COVID-19 estuvieron en el rango de 23 a 96 años, los pacientes COVID-19 estaban entre los 47-77 años, destacándose que en este grupo no hubo pacientes en el grupo de edad de 14 y 26 años (Tabla 4-1).

**Tabla 4-1:** Características sociodemográficas y clínicas de los pacientes.

Datos sociodemográficos y clínicos	Total de pacientes		Pacientes COVID-19		Pacientes sin COVID-19	
	(n=29)		(n=10)		(n=19)	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
<b>Género</b>						
Masculino	16	55%	7	70%	9	47%
Femenino	13	45%	3	30%	10	53%
<b>Edad</b>						
14 - 26 años	2	7%	0	0%	2	11%
27- 59 años	9	31%	4	40%	5	26%
>60 años	18	62%	6	60%	12	63%
Media (Rango)	61,1	(23-96)	62,1	(47-77)	60,6	(23-96)
<b>Desenlace</b>						
Fallecidos	9	31%	4	40%	5	26%
Vivos	20	69%	6	60%	14	74%

(n) número de aislamientos. (%) porcentaje correspondiente al grupo de CRKP

En cuanto al tipo de desenlace, la mortalidad fue mayor (40%) en el grupo COVID-19 con relación al grupo sin COVID-19 (26%) (Tabla 4-1).

Teniendo en cuenta el tipo de muestra de las que provenían las CRKP seleccionadas en este estudio (Tabla 4-2), se pudo establecer que la mayoría de las obtenidas de pacientes COVID-19 se recolectaron de hemocultivos (HEMO) (50%); seguidas de las de urocultivo, SOT y seno etmoidal y maxilar (14,3% c/u); y de la punta de un catéter (7,1%).

Por otra parte, el urocultivo fue el tipo de muestra de dónde más se aislaron CRKP provenientes de pacientes sin COVID-19 (36%), seguidas de hemocultivo (20%), SOT (12%), líquido peritoneal y secreción de columna (8% c/u), y de muestras obtenidas de hueso sacro, hueso vertebral sin especificar, secreción del hallux derecho y drenaje biliar (4% c/u).

**Tabla 4-2:** Tipos de muestras de donde fueron aisladas las CRKP incluidas en el estudio.

	Total de CRKP		CRKP aisladas de pacientes COVID-19		CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
<b>Número Total (n)</b>	<b>39</b>		<b>14</b>		<b>25</b>	
<b>Tipo de Muestra</b>						
Hueso sacro	1	2,6%	0	0%	1	4%
Secreción de columna	2	5,1%	0	0%	2	8%
Hueso vertebral	1	2,6%	0	0%	1	4%
URO	11	28,2%	2	14,3%	9	36%
HEMO	12	30,8%	7	50%	5	20%
SOT	5	12,8%	2	14,3%	3	12%
Seno etmoidal y maxilar	2	5,1%	2	14,3%	0	0%
Puntal de catéter	1	2,6%	1	7,1%	0	0%
Líquido peritoneal	2	5,1%	0	0%	2	8%
Drenaje biliar	1	2,6%	0	0%	1	4%
Secreción del hallux derecho	1	2,6%	0	0%	1	4%
<b>Servicio de Hospitalización</b>						
Hospitalización	17	43,6%	3	21,4%	14	56%
UCI	22	56,4%	11	78,6%	11	44%

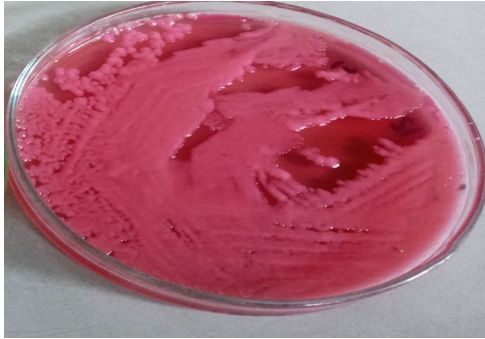
(n) número de aislamientos. (%) porcentaje correspondiente al grupo de CRKP. Tipo de muestra: URO: urocultivo; HEMO: Hemocultivo; SOT: Secreción Orotraqueal. Servicio de Hospitalización: UCI: unidad de cuidados intensivos.

Considerando el servicio donde estaban hospitalizados los pacientes al momento de la toma de la muestra para el cultivo de los aislamientos (Tabla 4-2), se observó que la proporción de pacientes en UCI con COVID-19 fue más alta (78,6%), que la de los pacientes en UCI sin COVID-19 (44%).

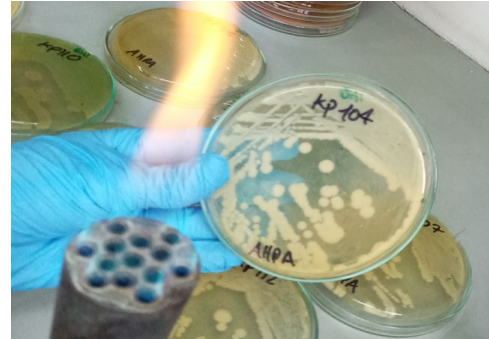
## 4.2 Identificación microbiológica de los aislamientos

En los 39 aislamientos CRKP enviados por el laboratorio del hospital se observaron colonias características a partir de la siembra del microorganismo en el medio BHI y en agar MacConkey, siendo este último un agar el que permitió observar la presencia de colonias fermentadoras de lactosa de color rosa característico (Figura 4-1).

**Figura 4-1:** Caracterización microbiológica de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas en agar MacConkey y Agar BHI.



Agar MacConkey



Agar BHI

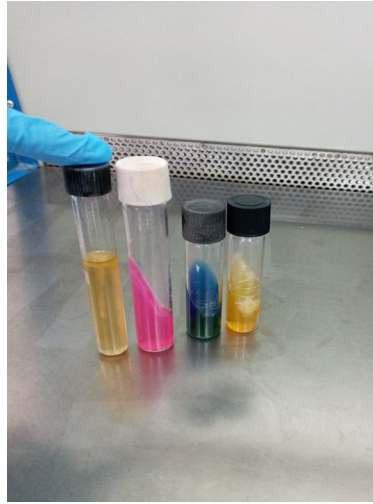
Por otra parte, la prueba de String test realizada en el agar BHI (Figura 4-2) reveló que 51,2% de los aislamientos totales del estudio fueron productores de hiper mucoviscosidad, dada la formación de una cuerda viscosa de más de 5mm de diámetro, una característica fenotípica de algunas *K. pneumoniae* especialmente aquellas hipervirulentas (Wu et al., 2017).

**Figura 4-2:** Prueba de String test



También, la identificación de las 39 *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas a través de cuatro pruebas bioquímicas básicas estuvieron acorde con lo esperado para *K. pneumoniae* (Figura 4-3) (Anexo 2).

**Figura 4-3:** Identificación bioquímica de *K. pneumoniae*.



SIM, Urea, Citrato de Simmons y TSI

### 4.3 Perfil fenotípico de susceptibilidad antimicrobiana

En los resultados de las pruebas fenotípicas de susceptibilidad antimicrobiana para los 39 aislamientos (Tabla 4-3), se observó que el 76% de las CRKP obtenidas de pacientes sin COVID-19 y 57% del otro grupo, fueron catalogados como multirresistentes (MDR), al ser resistentes al menos a un antibiótico perteneciente a tres clases o más de antibióticos; y se observó también que los aislamientos en general tenían una resistencia (R) amplia frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Por otra parte, derivado de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, se observó en el análisis de las tasas de resistencia antimicrobiana realizado en los dos grupos de CRKP (Tabla 4-4), que aquellas CRKP aisladas de pacientes COVID-19 presentaron un porcentaje de resistencia del (100%) frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos testeados como piperacilina/tazobactam, ceftriazona, cefazolina y cefepima; así mismo en carbapenémicos como ertapenem y meropenem. Comportamiento similar presentaron las CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 frente a cefazolina, ceftriazona y ertapenem; sin embargo las tasas de resistencia, fueron un poco más bajas frente a piperacilina/tazobactam, cefepima y meropenem, pues variaban entre el (80%) y el (96%).

**Tabla 4-3:** Pruebas fenotípicas de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos.

Paciente	Código del Aislamiento en el IBUN	Antibióticos $\beta$ -lactámicos							Otros antibióticos				CRKP (MDR)
		TZP	CRO	CFZ	FEP	FOX	ETP	MEM	CIP	AK	CN	SXT	
1	Kp021	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	X
	Kp018	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	X
	Kp019	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	X
2	Kp017	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	X
3	Kp024	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	X
4	Kp025	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	
5	Kp026	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	X
6	Kp027	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	x
	Kp029	R	R	R	R	I	R	I	R	S	R	R	X
	Kp030	R	R	R	R	I	R	I	R	S	R	R	X
	Kp031	R	R	R	R	I	R	I	R	S	R	R	X
	Kp032	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	
	Kp033	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	
8	Kp034	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	
9	Kp035	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	
10	Kp037	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	
11	Kp039	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	X
12	Kp048	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	X
13	Kp050	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	S	
	Kp052	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	X
14	Kp053	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	X
	Kp061	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	X
15	Kp062	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	X
16	Kp065	R	R	R	I	I	R	R	R	S	S	R	X
	Kp066	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	
17	Kp072	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	
18	Kp096	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	X
	Kp080	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	X
19	Kp082	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	X
20	Kp078	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	X
21	Kp089	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	X
22	Kp091	I	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	X
23	Kp101	R	R	R	R	I	R	I	S	S	R	S	
24	Kp103	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	X
25	Kp104	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	
26	Kp105	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	X
27	Kp108	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	
28	Kp119	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	X
29	Kp120	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	X

Los pacientes COVID-19 y sus aislamientos CRKP se encuentran sombreados en azul. CRKP (MDR): aislamientos que fueron catalogados como MDR y se encuentran demarcados con una (x); en azul aquellos resultados presentes en las CRKP aisladas de pacientes COVID-19. Resistente (R): recuadros de color rojo; Intermedio (I): recuadros de color amarillo y Sensible (S): recuadros de color verde. Antibióticos  $\beta$ -lactámicos:  $\beta$ -lactámicos/inhibidores: (TZP) piperacilina/ tazobactam; cefalosporinas: (CRO) ceftriazona, (CFZ) cefazolina, (FEP) cefepima, (FOX) ceftioxima; carbapenémicos: (ETP) ertapenem, (MEM) meropenem. Otros antibióticos: quinolonas: (CIP) ciprofloxacina; aminoglucósidos: (AK) amikacina, (CN) gentamicina; diaminopirimidinas+sulfonamidas: (SXT) trimetoprim-sulfametoxazol.

Se destaca que la diferencia más marcada en las tasas de resistencia frente a  $\beta$ -lactámicos presentes en los dos grupos de CRKP fue frente a cefoxitina, siendo mayor (92,9%) en las CRKP aisladas de pacientes COVID-19 que en las del otro grupo (52%) (Tabla 4-4).

Por otra parte, el análisis de las tasas de resistencia de los aislamientos CRKP obtenidos de pacientes COVID-19, frente a otra clase de antibióticos, revela que frente a ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol el 57,1% y el 50% de estos aislamientos respectivamente, resultaron ser resistentes (Tabla 4-4), mientras que los aislamientos obtenidos de pacientes sin COVID-19 tuvieron una resistencia un poco más alta frente a estos dos antibióticos, 80% y 72% respectivamente (Tabla 4-4).

En lo que respecta a las tasas de resistencia frente a amikacina, que fueron las más bajas del estudio, el 14,3% de los aislamientos CRKP obtenidos de pacientes COVID-19 fueron resistentes, mientras apenas el 4% de aislamientos pertenecientes al otro grupo fueron resistentes a este antibiótico (Tabla 4-4).

**Tabla 4-4:** Comportamiento de resistencia de los aislamientos CRKP del estudio frente a los antibióticos testeados.

Antibióticos	CRKP aisladas de pacientes COVID-19		CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19	
	n	%	n	%
Piperacilina/ Tazobactam	14	100%	24	96%
Ceftriazona	14	100%	25	100%
Cefazolina	14	100%	25	100%
Cefepima	14	100%	22	88%
Cefoxitina	13	92,9%	13	52%
Ertapenem	14	100%	25	100%
Meropenem	14	100%	20	80%
Ciprofloxacina	8	57,1%	20	80%
Amikacina	2	14,3%	1	4%
Gentamicina	5	35,7%	12	48%
Trimetoprim/Sulfametoxazol	7	50%	18	72%

(n) número de aislamientos; (%) porcentaje basado en los CRKP correspondientes.

Cabe resaltar que, previamente a la identificación en el hospital de los aislamientos CRKP a los pacientes del estudio se les administraron varias clases de antibióticos. Se pudo evidenciar que a los pacientes COVID-19 se les prescribió principalmente ampicilina/sulbactam (71,4%), seguido de cefepime (57,1%), linezolid (50%), piperacilina/tazobactam y vancomicina (35,7% c/u); meropenem y claritromicina en (28,6% c/u) (Tabla 4-5).

**Tabla 4-5:** Tratamiento antibiótico administrado previamente a los pacientes involucrados en el estudio.

Clase de Antibiótico	Tratamiento antibiótico previo administrado a los pacientes	CRKP aisladas de pacientes COVID-19 (n;%)	CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 (n; %)
β-lactámicos	piperacilina/tazobactam	(5; 35,7)	(12; 48%)
	ampicilina/sulbactam	(10; 71,4)	(2; 8%)
	ampicilina sódica	(2; 14,3)	(3; 12%)
	penicilina	(0; 0%)	(1; 4%)
	cefepima	(8; 57,1%)	(7; 28%)
	cefazolina	(2; 14,3%)	(1; 4%)
	ceftriaxona	(0; 0%)	(1; 4%)
	oxacilina	(2; 14,3%)	(0; 0%)
	aztreonam	(2; 14,3%)	(1; 4%)
	vancomicina,	(5; 35,7%)	(10; 40%)
	ertapenem	(1; 7,1%)	(2; 8%)
aminoglucósidos	meropenem	(4; 28,6%)	(14; 56%)
	amikacina	(0; 0%)	(3; 12%)
lincosamidas y estreptograminas	gentamicina	(1; 7,1%)	(0; 0%)
	clindamicina	(0; 0%)	(2; 8%)
macrólidos	eritromicina	(2; 14,3%)	(0; 0%)
macrólidos	claritromicina	(4; 28,6%)	(2; 8%)
oxazolidinonas fluoradas	linezolid	(7; 50%)	(5; 20%)
antifúngicos	anfotericina B	(2; 14,3%)	(0; 0%)
fluoroquinolonas	levofloxacin	(1; 7,1%)	(0; 0%)
	ciprofloxacina,	(3; 21,4%)	(2; 8%)

(n,%) número de aislamientos CRKP, porcentaje de aislamientos CRKP



**Tabla 4-5:** (Continuación)

Clase de Antibiótico	Tratamiento antibiótico previo administrado a los pacientes	CRKP aisladas de pacientes COVID-19 (n; %)	CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 (n; %)
diaminopirimidinas/sulfonamidas	trimetoprim/sulfametoxazol	(0; 0%)	(3; 12%)
nitroimidazoles	metronidazol	(3; 21,4%)	(4; 16%)
antifúngicos	fluconazol	(1; 7,1%)	(3; 12%)
	albendazol	(2; 14,3%)	(2; 8%)
	caspofungina	(1; 7,1%)	(5; 20%)
glicilciclinas	tigeciclina	(1; 7,1%)	(1; 4%)
cefalosporinas/inhibidor de $\beta$ -lactamasas	ceftazidima/avibactam	(1; 7,1%)	(1; 4%)
cefalosporinas/inhibidor de $\beta$ -lactamasas	ceftolozano/tazobactam	(1; 7,1%)	(0; 0%)
polipéptido	colistina	(1; 7,1%)	(1; 4%)
lipopéptido	daptomicina	(2; 14,3%)	(2; 8%)
polipéptido	polimixina B	(1; 7,1%)	(1; 4%)
derivados macrocíclicos de la lactona	ivermectina	(2; 14,3%)	(3; 12%)

(n;%): número de aislamientos CRKP, porcentaje de aislamientos CRKP

Por otro lado, a los pacientes sin COVID-19 se les prescribió principalmente meropenem (56%), seguido de piperacilina/tazobactam (48%), vancomicina (40%) y cefepima (28%) entre otros (Tabla 4-5).

#### 4.4 Extracción de ADN genómico

Los resultados de la cuantificación fluorométrica del ADN genómico (ADNg) extraído de las 39 CRKP mostraron una concentración promedio de ADNg de 98,6 ng/ $\mu$ L. Así mismo, en la evaluación de la calidad y pureza de ADNg se obtuvo un promedio de 1,92 para los valores de las relaciones de absorbancia 260/280 nm y de 1,94 para las relaciones de absorbancia 260/230 nm; por último, el ADNg de todos los aislamientos del estudio en el corrido electroforético demostró la presencia de bandas de buena calidad integras y sin la presencia de Smear (Figura 4-4). Es de destacar que, estos resultados en las 39 CRKP del estudio estaban dentro de los rangos esperados según los protocolos de extracción, lo que denota la obtención de un ADNg de buena concentración, integridad, calidad y pureza, libre de contaminantes como

proteínas y fenoles, así como de sales y carbohidratos, que podrían interferir en la preparación de las librerías y secuenciación posterior.

**Figura 4-4:** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de ADN genómico extraído de aislamientos CRKP



(MP) marcador de peso Molecular: HyperLadder™ 1 kb Plus. (CRKP): Kp048, Kp050, Kp052, Kp053, Kp061 y Kp062

## 4.5 Ensamblaje y Anotación

Los ensamblajes de los genomas de los 39 aislamientos CRKP secuenciados tuvieron un tamaño que osciló entre 5.2 Mpb y 6.0 Mpb con un promedio de 5.5 Mpb. El %GC varió entre 57,02 y 57,46, y la profundidad promedio fue de 95X. El número de contigs por ensamblaje varió de 28 a 207 con un promedio de 73, y el N50 varió entre 49.842 y 877.287 con un promedio de 277.338 (Anexo 3).

Comparando estas estadísticas del ensamblaje con las de otros estudios podemos observar ligeras variaciones normales este tipo de trabajos, y que los resultados de ensamblaje muestran una calidad dentro de los valores reportados en la literatura, como los de otro estudio realizado en 34 genomas de CRKP donde el tamaño de ensamblaje fue de  $5,516,119 \pm 134,003$  bp, el %GC de  $57 \pm 0.22$  y el número de contigs de  $92 \pm 16.98$  (Arabaghian et al., 2019).

En los resultados de la anotación realizada por el programa Prokka v1.13 (Anexo 4), se observa que las 39 CRKP tienen en promedio 5251 CDS, 78 tRNA, 9 rRNA, y 5478 genes

predichos, valores cercanos a los rangos de variación de otros estudios similares en genomas de *K. pneumoniae* los cuales presentaban entre 80 y 87 tRNA; 25 rRNA y de 4872 a 5316 número de CDS (Dong et al., 2018).

#### **4.6 Resistoma de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenemasas**

El programa RGI permitió establecer la presencia de 75 genes diferentes de resistencia a antibióticos en las 39 CRKP del estudio, los cuales están involucrados en los 4 mecanismos de resistencia utilizados por las CRKP. De estos diferentes genes el 45,3% están asociados a inactivación de antibiótico, el 28% al mecanismo de bombas de eflujo, el 24% a alteración o modificación en el sitio blanco y el 2,6% a permeabilidad reducida al antibiótico (Anexo 5) (Tablas 4-6 a 4-10). De esta forma, esos 75 genes le conferían a las CRKP del estudio resistencia a diferentes clases de antibióticos como:  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas, diaminopirimidinas, tetraciclinas, glicilciclina, fosfomicina, macrólidos, fenicoles, rifamicina, elfamicina, nitroimidazol, nitrofuranos, péptido, glucopeptidos y aminocumarina (Anexo 5) (Tablas 4-6 a 4-10).

En lo que respecta al análisis de los genes de resistencia asociados al mecanismo de inactivación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos presentes en los dos grupos de aislamientos (Anexo 5) (Tabla 4-6), es de resaltar que el gen *ampH* productor de las  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC estuvo presente en el (100%) de los genomas del estudio.

Sin embargo, algunos otros genes asociados a la producción de BLEEs clasificados en esta categoría tuvieron una distribución variable en los dos grupos de CRKP del estudio.

En lo que respecta a las CRKP pertenecientes a pacientes COVID-19 se encontraron los genes *TEM-1* (64%), *SHV-28* (57%), *OXA-1* (36%), *CTX-M-15* (36%), *SHV-11* (21%), *SHV-60* (7%) y *SHV-1* (7%). En contraste en lo que respecta a las CRKP provenientes de pacientes sin COVID-19, estas predominantemente albergaban el gen *CTX-M-15* (52%) seguido de *OXA-1* (48%), *SHV-11* (36%), *SHV-28* (32%), *TEM-1* (32%), *SHV-1* (16%), *SHV-60* (12%) y *LEN-17* (4%) (Tabla 4-6).

**Tabla 4-6:** Genes de resistencia asociados a Inactivación de antibióticos  $\beta$ -lactámicos presentes en los aislamientos CRKP.

Familia génica de Resistencia antimicrobiana	Clase de antibiótico	Genes de resistencia	CRKP aisladas de pacientes COVID-19 (n)	(%)	CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 (n)	(%)
<i>CTX-M</i> $\beta$ -lactamasas	cefalosporinas	<i>CTX-M-15</i>	5	36	13	52
<i>ampC</i> - $\beta$ -lactamasas	cefalosporinas, penicilinas	<i>ampH</i>	14	100	25	100
<i>LEN</i> $\beta$ -lactamasas	penicilinas	<i>LEN-17</i>	0	0	1	4
<i>OXA</i> $\beta$ -lactamasas	cefalosporinas, penicilinas	<i>OXA-1</i>	5	36	12	48
<i>SHV</i> $\beta$ -lactamasas	carbapenémicos; cefalosporinas, penicilinas	<i>SHV-1</i>	1	7	4	16
<i>SHV</i> $\beta$ -lactamasas		<i>SHV-11</i>	3	21	9	36
<i>SHV</i> $\beta$ -lactamasas		<i>SHV-28</i>	8	57	8	32
<i>SHV</i> $\beta$ -lactamasas		<i>SHV-60</i>	1	7	3	12
<i>TEM</i> $\beta$ -lactamasas	monobactámicos; cefalosporinas; penicilinas	<i>TEM-1</i>	9	64	8	32
<i>GES</i> $\beta$ -lactamasas	carbapenémicos; cefalosporinas, penicilinas	<i>GES-2</i>	0	0	1	4
<i>KPC</i> $\beta$ -lactamasas	monobactámicos; carbapenémicos; cefalosporinas, penicilinas	<i>KPC-2</i>	2	14	9	36
<i>KPC</i> $\beta$ -lactamasas		<i>KPC-3</i>	12	86	14	56
<i>NDM</i> $\beta$ -lactamasas	carbapenémicos; cefalosporinas; cefamicinas, penicilinas	<i>NDM-1</i>	1	7	1	4
<i>OXA</i> $\beta$ -lactamasas	carbapenémicos; cefalosporinas, penicilinas	<i>OXA-2</i>	2	14	3	12

(n) número de aislamientos. (%) porcentaje del grupo de CRKP correspondiente con la presencia del gen.

En lo que se refiere a los genes causantes de la resistencia a otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos como los carbapenémicos, se detectó que el gen *KPC-3* fue el más predominante en las CRKP aisladas de pacientes COVID-19 (86%) y aunque un poco menos en los aislamientos provenientes de los pacientes sin COVID-19 (56%). También se detectó la presencia del gen *KPC-2*, cuya distribución fue menor en los dos grupos en estudio, aunque presente en un mayor número de genomas de CRKP provenientes de pacientes sin COVID-19 (36%) que los COVID-19 (14%) (Tabla 4-6).

Es de resaltar que se encontraron aislamientos obtenidos de pacientes con y sin COVID-19 que tenían simultáneamente de los genes *KPC-3+OXA-2* y *KPC-3+NDM-1*. Se encontró además que el aislamiento Kp082, obtenido de un paciente sin COVID-19, era portador en su genoma de 4 genes asociados a resistencia a carbapenémicos: *GES-2*, *KPC-3*, *NDM-1*, *OXA-2* (Anexo 5).

Por otra parte, los aislamientos Kp024 y Kp037, pertenecientes a pacientes sin COVID-19, con resistencia fenotípica observada a carbapenémicos (Tabla 4-3), no portaban genes asociados a carbapenemasas en su resistoma, pero si los genes *OmpK37*, *TEM-1*, *SHV-1* y *ampH*, el primero asociado a porinas y el resto a inactivación de antibiótico (Anexo 5).

En relación con el mecanismo de inactivación de antibióticos, habían otros genes presentes en los dos grupos de aislamientos CRKP del estudio con distribuciones variadas que estaban relacionados con resistencia hacia otra clase de antibióticos como aminoglucósidos, fluoroquinolonas, glicopéptidos, fosfomicina, macrólidos, fenicol y rifamicina (Tabla 4-7).

En cuanto al mecanismo de inactivación a aminoglucósidos se observó la presencia de 13 genes diferentes (Tabla 4-7). Se pudo observar también que algunos genes estaban presentes en una menor proporción de los genomas de CRKP aisladas de pacientes COVID-19, tal como el gen *AAC(6')-Ib-cr* asociado también a la resistencia a fluoroquinolonas, ligeramente menos distribuido en este grupo (36%) que en el grupo de genomas de CRKP provenientes de pacientes COVID-19 (56%), comportamiento similar al del gen *APH(6)-Id* (36% y 48% respectivamente).

Por el contrario el gen *CatI* relacionado con la inactivación de fenicoles, fue identificado en un mayor número de genomas aislados de pacientes COVID-19 (50%) que en los del otro grupo de CRKP (28%).

Por otra parte, algunos genes se encontraron solamente en uno de los grupos. El gen *APH(3')-VI* solo se encontró en genomas de CRKP aisladas del pacientes COVID-19, mientras que los genes *AAC(6')-Ib10*, *aadA16*, asociados a la resistencia a aminoglucósidos; y *BRP(MBL)*, asociado a la resistencia a bleomicina, solo se encontraron en aislamientos de pacientes sin COVID-19 (Tabla 4-7).

**Tabla 4-7:** Genes de resistencia asociados a Inactivación de otros antibióticos presentes en los aislamientos CRKP.

Familia génica de Resistencia antimicrobiana	Clase de antibiótico	Genes de resistencia	CRKP aisladas de pacientes COVID-19 (n)	(%)	CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 (n)	(%)
<i>APH(3')</i>	aminoglucósidos	<i>APH(3')-VI</i>	2	14	0	0
<i>APH(3'')</i>		<i>APH(3'')-Ib</i>	1	7	2	8
<i>APH(4)</i>		<i>APH(4)-Ia</i>	3	21	4	16
<i>APH(6)</i>		<i>APH(6)-Id</i>	5	36	12	48
<i>AAC(6')</i>		<i>AAC(6')-Ian</i>	1	7	1	4
<i>AAC(6'')</i>		<i>AAC(6'')-Ib10</i>	0	0	1	4
<i>AAC(6')</i>	fluoroquinolonas aminoglucósidos	<i>AAC(6')-Ib-cr</i>	5	36	14	56
<i>AAC(3)</i>	aminoglucósidos	<i>AAC(3)-IV</i>	3	21	4	16
<i>AAC(3)</i>		<i>AAC(3)-Ile</i>	2	14	6	24
<i>ANT(2'')</i>		<i>ANT(2'')-Ia</i>	1	7	2	8
<i>ANT(3'')</i>		<i>aadA2</i>	4	29	4	16
<i>ANT(3''')</i>		<i>aadA</i>	3	21	4	16
<i>ANT(3''')</i>		<i>aadA16</i>	0	0	2	8
Proteína de resistencia a Bleomicina	glicopéptido	<i>BRP(MBL)</i>	0	0	1	4
fosfomicina-tiol-transferasa	fosfomicina	<i>FosA5</i>	1	7	6	24
		<i>FosA6</i>	12	86	19	76
macrólidos fosfotransferasas ( <i>MPH</i> )	macrólido	<i>mphA</i>	3	21	3	12
cloramfenicol acetiltransferasa ( <i>CAT</i> )	fenicoles	<i>catB3</i>	1	7	1	4
		<i>catI</i>	7	50	7	28
rifampicina ADP-ribosiltransferasa ( <i>Arr</i> )	rifamicinas	<i>arr-3</i>	1	7	2	8

(n) número de aislamientos. (%) porcentaje del grupo de CRKP correspondiente con la presencia del gen.

Relacionados con la resistencia a otros antibióticos, los demás genes estaban presentes en menos del 25% de las CRKP, con distribuciones similares en los dos grupos de estos aislamientos. Entre ellos se identificaron genes como *catB3*, asociado a la resistencia a fenicoles, *mphA* relacionado con la resistencia a macrólidos, *arr-3* con la resistencia a rifamicina y *FosA5* relacionado con la resistencia a fosfomicina (Tabla 4-7). Se destaca como *FosA6* relacionado también con la resistencia a este último antibiótico, estaba presente en alta frecuencia, con distribuciones similares mayores al (75%), en los dos grupos de CRKP.

En cuanto al mecanismo de resistencia relacionado con las bombas de eflujo se encontraron genes que estaban en el 100% de las CRKP del estudio tales como: *LptD*, *KpnH*, *KpnG*, *KpnF*, *KpnE*, *H-NS*, *CRP* involucrados en la expulsión de antibióticos  $\beta$ -lactámicos; los genes *baeR*, *KpnH*, *KpnG*, *KpnF*, *KpnE* en la expulsión de aminoglucósidos; los genes *emrR*, *adeF*, *rsmA*, *KpnH*, *KpnG*, *CRP*, *H-NS* en la expulsión de fluoroquinolonas; los genes *KpnH*, *KpnG*, *KpnF*, *KpnE*, *H-NS*, *CRP* en la expulsión de macrólidos; el gen *rsmA* en la expulsión de diaminopirimidinas y fenicol; los genes *KpnF*, *KpnE*, *H-NS*, *adeF* en la expulsión de tetraciclinas; los genes *LptD*, *KpnH*, *KpnG*, *KpnF*, *KpnE* en la expulsión de péptidos; los genes *LptD*, *baeR* en la expulsión de aminocumarina; los genes *KpnF*, *KpnE*, *LptD* en la expulsión de rifamicina; y el gen *msbA* en la expulsión de nitroimidazoles (Tabla 4-8).

Por otro lado, genes como *oqxA* y *marA*, asociados a este mecanismo de resistencia de bombas de eflujo, también estaban distribuidos en alta proporción, presentes en el 100% de las CRKP aisladas de pacientes COVID-19, pero en 92% y 96% respectivamente de las CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 confiriendo resistencia a múltiples clases de antibióticos.

Cabe señalar que en los genomas de los dos grupos de CRKP en estudio fueron identificados genes que se encontraban en menor frecuencia (menor al 25%), con distribuciones similares en los dos grupos de CRKP, tales como *qacEdelta1* asociado con resistencia a antisépticos y desinfectantes; *cmIA1* que confería resistencia a fenicol; *qacH* asociado con resistencia a fluoroquinolonas y *oxqB*, que además de resistencia a este último antibiótico también está asociado a la resistencia a otros antibióticos.

Se encontró además, que los genes asociados a la resistencia a tetraciclinas eran los que más tenían distribuciones de frecuencia variables en los dos grupos de estudio, resaltando que *tet(B)* fue solo hallado en una CRKP aislada de 1 paciente COVID-19 (Tabla 4-8).

**Tabla 4-8:** Genes de resistencia asociados a bombas de eflujo presentes en los aislamientos de CRKP.

Familia génica de Resistencia antimicrobiana	Clase de antibiótico	Genes de resistencia	CRKP aisladas de pacientes COVID-19 (n)	(%)	CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 (n)	(%)
casete de unión a ATP (ABC)	carbapenémicos, péptidos, aminocumarínico, rifamicinas	<i>LptD</i>	14	100	25	100
	nitroimidazoles	<i>msbA</i>	14	100	25	100
superfamilia del facilitador mayor (MFS)	fluoroquinolonas	<i>emrR</i>	14	100	25	100
	macrólidos; fluoroquinolonas; aminoglucósidos; carbapenémicos; cefalosporinas; penicilinas; péptido	<i>KpnH</i>	14	100	25	100
	macrólidos; aminoglucósidos; cefalosporinas; tetraciclina; péptidos; rifamicinas	<i>KpnG</i>	14	100	25	100
	macrólidos; aminoglucósidos; cefalosporinas; tetraciclina; péptidos; rifamicinas	<i>KpnF</i>	14	100	25	100
	macrólidos; aminoglucósidos; cefalosporinas; tetraciclina; péptidos; rifamicinas	<i>KpnE</i>	14	100	25	100
	agentes desinfectantes y antisépticos	<i>qacEdelta1</i>	3	21	5	20
	fenicoles	<i>cmlA1</i>	3	21	4	16
		<i>tet(A)</i>	4	29	12	48
		<i>tet(B)</i>	1	7	0	0
		<i>tet(D)</i>	2	14	1	4
MFS ; RND	macrólidos; fluoroquinolonas; cefalosporinas; cefamicinas; tetraciclinas	<i>H-NS</i>	14	100	25	100
resistencia a división por nodulación (RND)	aminoglucósidos; aminocumarínicos	<i>baeR</i>	14	100	25	100
	fluoroquinolonas; tetraciclinas	<i>adeF</i>	14	100	25	100
	fluoroquinolonas; diaminopirimidinas; fenicoles	<i>rsmA</i>	14	100	25	100
	fluoroquinolonas; gliciliclinas; tetraciclinas; diaminopirimidina; nitrofuranos	<i>oqxA</i>	14	100	23	92
	fluoroquinolonas; gliciliclinas; tetraciclinas; diaminopirimidinas; nitrofuranos	<i>oqxB</i>	3	21	5	20
	macrólidos; fluoroquinolonas	<i>CRP</i>	14	100	25	100
resistencia pequeña a multifármacos (SMR)	fluoroquinolonas	<i>qacH</i>	3	21	4	16
RND; Porina con reducida permeabilidad a antibióticos β-lactámicos	fluoroquinolonas; monobactámicos; carbapenémicos; cefalosporinas; gliciliclinas; cefamicinas; tetraciclinas; rifamicinas; fenicoles; triclosán; penicilinas	<i>marA</i>	14	100	24	96

(n) número de aislamientos. (%) porcentaje del grupo de CRKP correspondiente con la presencia del gen.

Por otra parte, considerando a los genes involucrados con la alteración o modificación del sitio blanco del antibiótico (Tabla 4-9), todas las CRKP del estudio albergaban genes



relacionados con resistencia a fosfomicina como *UhpT* y péptidos tales como *eptB* y *ArnT*. Además se encontraron genes presentes en alta frecuencia (en más del 70% de los aislamientos) con distribuciones similares en los dos grupo de CRKP, tales como *PBP3* asociado con resistencia a  $\beta$ -lactámicos, y *EF-Tu* que confiere resistencia a elfamicina.

**Tabla 4-9:** Genes de resistencia asociados a modificación del sitio blanco presentes en los aislamientos CRKP.

Familia génica de Resistencia antimicrobiana	Clase de antibiótico	Genes de resistencia	CRKP aisladas de pacientes COVID-19 (n)	(%)	CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 (n)	(%)
Mutaciones de la proteína de unión a la Penicilina	cefalosporinas; cefamicinas; penicilinas	<i>PBP3</i>	13	93	25	100
<i>EF-Tu</i> de resistencia a Elfamicina	elfamicina	<i>EF-Tu</i>	10	71	20	80
<i>gyrA</i> resistente a fluoroquinolonas	fluoroquinolonas	<i>gyrA</i>	4	29	5	20
<i>parC</i> resistente a fluoroquinolonas	fluoroquinolonas	<i>parC</i>	4	29	5	20
<i>UhpT</i> resistente a antibiótico	fosfomicina	<i>UhpT</i>	14	100	25	100
<i>Erm</i> 23S ribosomal RNA metiltransferasa	macrólido; lincosamidas; estreptograminas	<i>ErmB</i>	2	14	0	0
<i>pmr</i> fosfoetanolamina transferasa	péptido	<i>eptB</i>	14	100	25	100
		<i>ArnT</i>	14	100	25	100
(qnr) proteína resistente a quinolona	fluoroquinolonas	<i>QnrB1</i>	4	29	11	44
		<i>QnrB6</i>	0	0	2	8
		<i>QnrS1</i>	1	7	0	0
dihidrofolato reductasa resistente a trimetoprim <i>dfr</i>	diaminopirimidinas	<i>dfrA6</i>	0	0	1	4
		<i>dfrA12</i>	1	7	0	0
		<i>dfrA14</i>	4	29	13	52
		<i>dfrA27</i>	0	0	2	8
resistencia a sulfonamidas <i>sul</i>	sulfonamidas	<i>sul1</i>	3	21	5	20
		<i>sul2</i>	4	29	13	52
		<i>sul3</i>	3	21	4	16

(n) número de aislamientos. (%) porcentaje del grupo de CRKP correspondiente con la presencia del gen.

Adicionalmente, se encontraron genes con frecuencias bajas, pero con distribuciones similares como *gyrA* y *parC*, los dos presentes en el 29% aislamientos COVID-19 y el 20% sin COVID-19, asociados a la resistencia a quinolonas. Algo similar sucedió con *Sul1* y *sul3*, asociados a la resistencia a sulfonamidas, presentes en menos del 25% de los genomas de estos dos grupos de aislamientos.

También, con relación a los genes involucrados en el mecanismo de modificación del sitio blanco, se encontraron algunos de ellos presentes solamente en uno de los grupos de aislamientos en estudio. En el 14% de las CRKP aisladas de pacientes COVID-19, se identificó el gen *ErmB*, relacionado con la resistencia a macrólidos; en el 7% se identificó el gen *QnrS1*, relacionado a la resistencia a fluoroquinolonas; y en el 7% el gen *dfrA12*, relacionado con la resistencia a trimetoprim. Por el otro lado, los genes, *QnrB6* (8%) relacionado con la resistencia a fluoroquinolonas; *drfA6* (4%) y *dfrA27* (8%), relacionados con la resistencia a trimetoprim, fueron hallados solamente en los genomas de las CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19.

Finalmente, se encontraron genes asociados al mecanismo de modificación del sitio blanco con diferencias en su distribución entre los dos grupos de CRKP. Entre estos, *QnrB1* asociado la resistencia a fluoroquinolonas más frecuente en las CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 (44%) que en las CRKP del otro grupo (29%); *drfA14* (52% y 29% respectivamente), perteneciente a la familia dihidrofolato reductasa y asociado a la resistencia a trimetoprim; y *sul2* (52% y 29% respectivamente), asociado a la resistencia a sulfonamidas.

En relación con los genes relacionados con el mecanismo de permeabilidad reducida al antibiótico (Tabla 4-10), mediado por la familia génica de las porinas, asociados con resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, se encontró que *OmpK37* estaba presente en el 100% de los aislamientos en estudio, mientras que el gen *OmpA* fue hallado en casi la mitad de los dos grupos de CRKP del estudio.

**Tabla 4-10:** Genes de resistencia asociados a permeabilidad reducida presentes en los aislamientos CRKP.

Familia génica de Resistencia antimicrobiana	Clase de antibiótico	Genes de resistencia	CRKP aisladas de pacientes COVID-19 (n)	(%)	CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 (n)	(%)
Porina bacteriana general con reducida permeabilidad a $\beta$ -lactámicos	monobactámicos; carbapenémicos; cefalosporinas; cefamicinas; penicilinas	<i>OmpK37</i>	14	100	25	100
		<i>OmpA</i>	7	50	12	48

(n) número de aislamientos. (%) porcentaje del grupo de CRKP correspondiente con la presencia del gen.

## 4.7 Tipificación de Secuencias Multilocus (MLST)

El análisis de tipificación por MLST de los 39 aislamientos CRKP del estudio reveló la diversidad genética de estas CRKP, resaltando la presencia de 14 diferentes secuencia tipos (STs) basados en el perfil alélico de los genes: *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* y *tonB* como se observa en la (Tabla 4-11). Se encontró que 2 de estos STs eran nuevos, dado que sus perfiles alélicos fueron diferentes a los ya reportados en la base de datos, según los resultados del programa MLST (T. Seemann, 2022a); estos eran los STs correspondientes a un aislamiento de un paciente COVID-19, el Kp032 y otro de un paciente sin COVID-19, el Kp105 (Anexo 5).

**Tabla 4-11:** Perfiles alélicos de los MLST obtenidos y su distribución en los grupos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos del estudio.

MLST	Perfil Alélico							CRKP (n*)	(%)	CRKP (n**)	(%)	CRKP (n***)	(%)
	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>						
1082	2	5	1	1	1	1	19	17	43,6	7	41,2	10	58,8
1563	16	24	21	27	194	33	259	1	2,6			1	100
392	3	4	6	1	7	4	40	1	2,6			1	100
14	1	6	1	1	1	1	1	1	2,6	1	100		
307	4	1	2	52	1	1	7	1	2,6	1	100		
236	2	1	1	1	16	1	4	3	7,7			3	100
-	2	1	1	1	16	1	4,4	1	2,6	1	100		
244	2	5	1	1	1	1	24	1	2,6			1	100
258	3	3	1	1	1	1	79	7	17,9	3	42,9	4	57,1
37	2	9	2	1	13	1	16	1	2,6			1	100
219	2	1	2	3	27	1	39	1	2,6	1	100		
17	2	1	1	1	4	4	4	2	5,1			2	100
412	2	1	2	1	9	1	112	1	2,6			1	100
-	2	3	1	1	10	46	19	1	2,6			1	100

En azul los aislamientos MLST obtenidos de pacientes COVID-19. (n\*) número de CRKP totales. (n\*\*) número de CRKP aisladas de pacientes COVID-19. (n\*\*\*) número de CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19. (%) porcentaje correspondiente a cada grupo CRKP.

Respecto a la distribución de los aislamientos (Tabla 4-11), los tipificados como ST1082 fueron los más frecuentes (43,6%), seguidos de los ST258 (17,9%), ST236 (7,7%) y ST17 (5,1%). Los secuencia tipos ST412, ST1563, ST392, ST244, ST37, ST14, ST307 y ST219, fueron identificados solamente en un aislamiento cada uno.

Se destaca que ST1082 y ST258 estaban asociados a CRKP provenientes de los dos grupos de pacientes del estudio, mientras que ST236, ST17, ST1563, ST392, ST244, ST37 y ST412, solo a aislamientos de pacientes sin COVID-19, y ST14, ST307 y ST219, únicamente de pacientes COVID-19 (Tabla 4-11).

## 4.8 Análisis Filogenético

El árbol filogenético basado en máxima verosimilitud utilizando los SNPs del core del genoma de cada una de las 39 CRKP (Figura 4-5), muestra 12 linajes distintos de estas CRKP, lo que da cuenta de una alta diversidad genética presente en estos aislamientos.

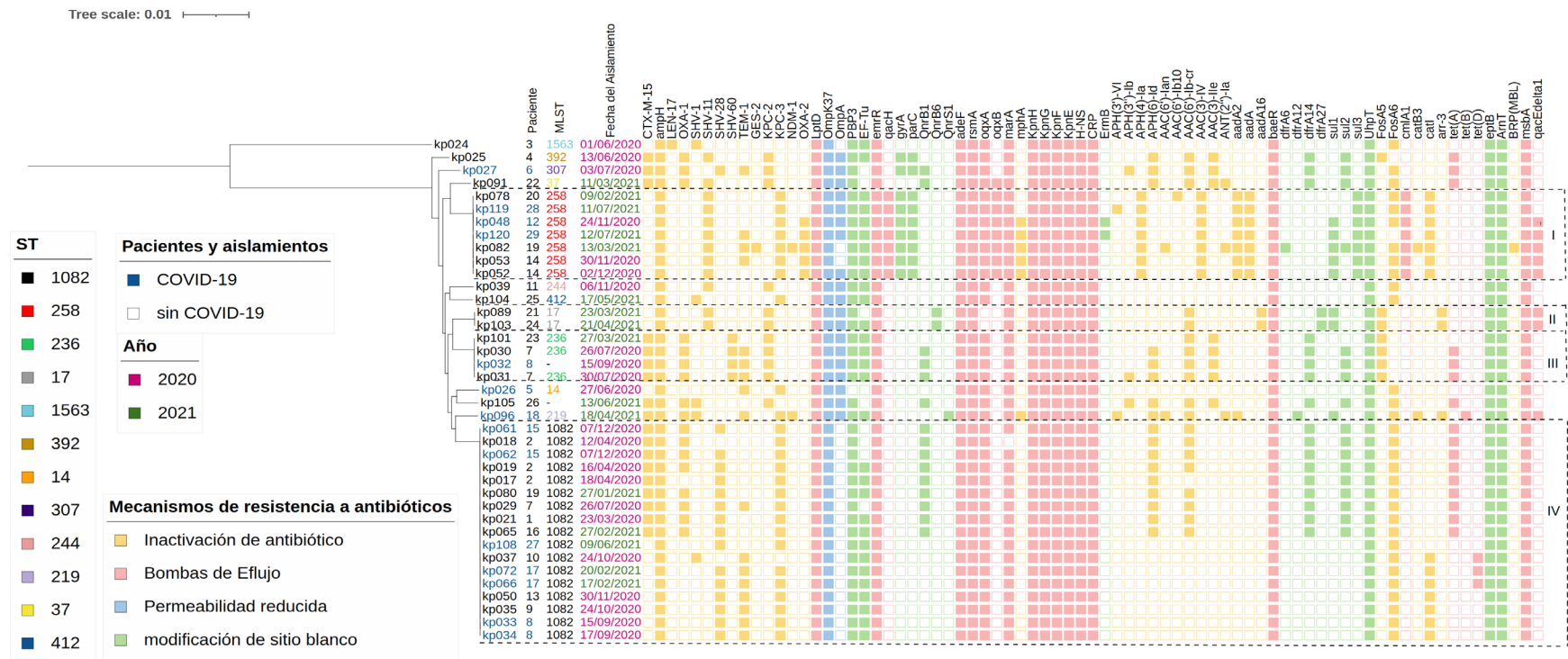
Como se muestra en la (Figura 4-5) existen cuatro clados I, II, III, y IV en los cuales se agruparon el 76,9% de las CRKP del presente estudio, siendo los aislamientos dentro de los clados II, III y IV, catalogados como clonales, puesto que la distancia de SNPs entre ellos es menor de 50 SNPs.

En el clado I los 7 aislamientos fueron asignados al ST258, de los cuales 3 fueron aislados de pacientes COVID-19 entre los meses de noviembre de 2020 y julio del 2021, y 4 de pacientes sin COVID-19 entre los meses de noviembre 2020 y marzo del 2021 (Figura 4-5).

En el clado II se agruparon 2 de las CRKP, ambas tipificadas como ST17, y cuyos aislamientos fueron únicamente de pacientes sin COVID-19, realizados en marzo y abril del 2021.

El clado III, agrupó 4 aislamientos de los cuales 3 provenientes de pacientes sin COVID-19 fueron tipificados como ST236 y se encontraron circulando en el hospital entre julio de 2020 y marzo 2021, y un aislamiento obtenido en septiembre del 2020 de un paciente COVID-19, al cual no se le pudo asignar un ST conocido, con relación clonal ya que presentó una diferencia de menor a 50 SNPs con relación a los demás genomas en este clado.

**Figura 4-5:** Árbol filogenético basado en los SNPs del core de las 39 *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos del estudio aisladas tanto de pacientes COVID-19 como de pacientes sin COVID-19.



En letra azul están el número de los pacientes y de las CRKP correspondientes que indican que fueron aisladas de pacientes COVID-19. MLST: tipificación de secuencias multilocus. Genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos asociados a BLEEs: CTX-M-15, ampH, LEN-17, OXA-1, SHV-1, SHV-11, SHV-28, SHV-60, TEM-1 () y GES-2, KPC-2, KPC-3, NDM-1, OXA-2; genes asociados a carbapenemasas: SHV-1, SHV-11, SHV-28, SHV-60, LptD, OmpK37, OmpA, PBP3, KpnH, KpnG, KpnF, KpnE, H-NS, CRP, marA; genes de resistencia a la famicina: EF-Tu; aminoglucósidos: APH(3)-VI, APH(3)-Ib, APH(4)-Ia, APH(6)-Id, AAC(6)-Ia, AAC(6)-Ib10, AAC(3)-IV, AAC(3)-Ile, ANT(2)-Ia, aadA2, aadA, aadA16. AAC(6)-Ib-cr, baeR, KpnH, KpnG, KpnF, KpnE; fluoroquinolonas: emrR, qacH, gyrA, parC, QnrB1, QnrB6, QnrS1, adeF, rsmA, oqxA, oqxB, marA, KpnH, KpnG, H-NS, CRP, AAC(6)-Ib-cr; macrólidos: mphA, ErmB, KpnH, KpnG, KpnF, KpnE, H-NS, CRP; diaminopirimidinas (Trimetoprim): dfrA6, dfrA12, dfrA14, dfrA27, rsmA, oqxA, oqxB; nitrofuranos: oqxA, oqxB; sulfonamida: sul1, sul2, sul3; fosfomicina: UhpT, FosA5, FosA6; fenicol: cmlA1, catB3, catI, rsmA, marA. Rifamicina: arr-3, marA, KpnF, KpnE, LptD; tetraciclina: tet(A), tet(B), tet(D), KpnF, KpnE, H-NS, adeF, oqxA, oqxB, marA; glicilicilina (tigeciclina): oqxA, oqxB, marA; péptidos: eptB, AmT, KpnH, KpnG, KpnF, KpnE, LptD; glicopéptido: BRP(MBL); nitroimidazol: msbA; antisépticos: qacEdelta1; triclosán: marA; aminocumarina: LptD y baeR.

Finalmente, el clado IV, fue el clado mayoritario conformado por 17 aislamientos CRKP todos tipificados como ST1082, de los cuales 7 fueron obtenidos de pacientes COVID-19 desde septiembre del 2020 hasta junio del 2021, y los restantes 10, aislados de pacientes sin COVID-19 desde marzo del 2020 hasta febrero del 2021. Se observa como las CRKP de este clado circularon entre hospitalización y UCI en el año 2020 y solo en la UCI en el año 2021 (Anexo 6) (Figura 4-5).

En cuanto a los pacientes que tenían múltiples aislamientos en el estudio (Anexo 1), en el árbol filogenético basado en SNPs (Figura 4-5) se demostró que en algunos de ellos se aislaron dos tipos diferentes de CRKP, como en el caso del paciente número 7 sin COVID-19 con 3 aislamientos, de los cuales dos (Kp030 y Kp031) se agruparon en el clado III (ST236) y otro (Kp029), en el clado IV (ST1082); el paciente 19 sin COVID-19 por su parte tenía un aislamiento (Kp080) que se agrupó dentro del clado IV (ST1082) y otro (Kp082), dentro del clado I (ST258); y finalmente, el paciente 8 con COVID-19 del que se obtuvieron dos aislamientos (Kp033 y Kp034) agrupados en el clado IV (ST1082) y otro (Kp032), en el clado III (nuevo ST). Por el contrario los aislamientos de los pacientes 2,14,15 y 17, se agruparon en el mismo clado (Figura 4-5).

Como ya se había mencionado, todos los aislamientos de CRKP del estudio presentaron un resistoma central, conformado por genes presentes en el 100% de estos, asociados a los 4 mecanismos de resistencia. Dentro de estos los genes *ampH*, *OmpK37*, *LptD* *KpnH*, *KpnG*, *KpnF*, *KpnE*, *H-NS* y *CRP* les confieren resistencia frente a  $\beta$ -lactámicos; y los genes *KpnH*, *KpnG*, *KpnF*, *KpnE*, *H-NS*, *CRP*, *LptD*, *emrR*, *adeF*, *rsmA*, *baeR*, , *msbA*, *UhpT*, *eptB* y *ArnT*, están asociados a resistencia a múltiples clases de antimicrobianos (Anexo 5) (Figura 4-5) (Tablas 4-6 a 4-10).

Sin embargo, se observó que la distribución del resistoma presente en los aislamientos CRKP del estudio en los diferentes linajes del árbol filogenético era variable, incluso dentro de los mismos clones habían diferencias en los resistomas de las CRKP pertenecientes a ellos, esto asociado quizás a elementos genéticos móviles, ya que se demostró que (13/16;81%) de los genes que variaban entre los aislamientos pertenecientes al clado IV estaban presentes en plásmidos en distintas CRKP donde se hallaron (Anexo 7). La localización de los genes en los plásmidos se pudo establecer gracias a que en el análisis bioinformático realizado durante el ensamblaje, el programa desarrollado por el grupo de

Bioinformática, utilizó 4 diferentes aproximaciones para establecer si un contig es parte de un plásmido o no (Talero Osorio, 2022).

Al observar el resistoma del clado II (Figura 4-5), los genomas que lo conforman portaban genes de resistencia asociados a antibióticos  $\beta$ -lactámicos como: *KPC-2*, *SHV-11*, *OmpA*, *PBP3*; además, de otros genes de resistencia como *QnrB6*, *marA*, *AAC(6')-Ib-cr*, *aadA16*, *dfrA27*, *sul1*, *FosA5*, *arr-3* y *qacEdelta1*, asociados a la resistencia a otros antibióticos así como a antisépticos y desinfectantes. Sin embargo, las dos CRKP de este clado solo se diferenciaban porque una portaba el gen *EF-Tu* asociado a la resistencia a elfamicina y la otra no.

En lo que respecta al clado III (Figura 4-5) habían genes presentes en todos los aislamientos asociados a la resistencia a  $\beta$ -lactámicos como: *KPC-2*, *SHV60*, *OXA-1*, *CTX-M-15*, *OmpA*, *PBP3* y asociados a la resistencia a otros antibióticos como *EF-Tu*, *oqxA*, *marA*, *AAC(6')-Ib-cr*, *AAC(3)-Ile*, *dfrA14*, *fosA5*. Sin embargo, a diferencia del aislamiento Kp101-ST236 se observa en los aislamientos Kp030-ST236, Kp031-ST236 y Kp032-ST-nuevo, la presencia adicional de los genes *TEM-1*, *QnrB1*, *APH(6)-Id*, *sul2* y *tet(A)*, e incluso, con respecto a los anteriores, la presencia adicional del gen *APH(3'')-Ib* en el aislamiento Kp031-ST236.

Finalmente, en el clado IV (Figura 4-5) los genes *ampH*, *OmpK37*, *LptD*, *KpnH*, *KpnG*, *KpnF*, *KpnE*, *H-NS*, *CRP*, *PBP3*, *fosA6*, *emrR*, *adeF*, *rsmA*, *baeR*, *msbA*, *UhpT*, *eptB*, *ArnT* *OqxA* estaban presentes en el 100% de los aislamientos del clado. Sin embargo, en este clado IV no se presentó una distribución homogénea de los genes presentes en este, incluso se aprecian dos grupos con distintas distribuciones de los genes.

En el primer grupo de CRKP pertenecientes al clado IV se observa cómo los aislamientos Kp061 y Kp062, provenientes del paciente COVID-19 número 15, presentaban los genes de resistencia asociados a  $\beta$ -lactámicos: *ampH*, *SHV-28*, *KPC-3*, *LptD*, *OmpK37*, *PBP3*, *OXA-1*, *CTX-M-15* y a otros antibióticos: *emrR*, *adeF*, *rsmA*, *oqxA*, *marA*, *KpnH*, *KpnG*, *KpnF*, *KpnE*, *H-NS*, *CRP*, *baeR*, *UhpT*, *FosA6*, *eptB*, *ArnT*, *msbA*, *APH(6)-Id*, *AAC(6')-Ib-cr*, *QnrB1*, *tet(A)*, *dfrA14*, *sul2*. Igualmente, los aislamientos Kp019, Kp021, Kp065 y Kp080, obtenidos de distintos pacientes sin COVID-19, tenían los mismos genes, aunque

en estos últimos se encontró adicionalmente el gen *EF-Tu*, asociado a la resistencia a elfamicina.

Así mismo, incluso otros aislamientos presentes en este primer grupo de CRKP del clado IV como: Kp017 y Kp018, aislados del paciente sin COVID-19 número 2; variaban en sus resistomas, por un lado, el Kp017 se parecía más a otro aislamiento de este paciente 2, el Kp019 mencionado anteriormente, pero a diferencia de este no tenía *OXA-1*, ni *AAC(6')-Ib-cr*. Por otra parte, Kp018 portaba los mismos genes de los aislamientos mencionados, el Kp061 y Kp062, pero a diferencia de estos no tenía *marA* y *SHV-28* dentro de su resistoma. De manera similar, el Kp029, aislado del paciente sin COVID-19, identificado con el número 7, albergaba *TEM-1* en su resistoma y esto lo hacía diferente en el resistoma de los aislamientos Kp061 y Kp062.

Por otra parte, el segundo grupo de CRKP pertenecientes a este clado IV lo conformaban los aislamientos Kp066 y K072, obtenidos del paciente COVID-19 número 17, los cuales tenían los genes asociados a resistencia a  $\beta$ -lactámicos tales como *ampH*, *SHV-28*, *KPC-3*, *LptD*, *OmpK37*, *PBP3*, *TEM-1*; además de otros genes asociados a la resistencia a distintas clases de antibióticos como: *emrR*, *adeF*, *rsmA*, *oqxA*, *marA*, *KpnH*, *KpnG*, *KpnF*, *KpnE*, *H-NS*, *CRP*, *baeR*, *UhpT*, *FosA6*, *eptB*, *ArnT*, *msbA*, *tet(D)*, *EF-Tu*, *catI*. Similarmente, todos estos genes, exceptuando *tet(D)*, también fueron hallados en los genomas de los aislamientos Kp035 y Kp050, pertenecientes a los pacientes sin COVID-19 identificados como 9 y 13 respectivamente, y en los aislamientos Kp033 y Kp034, obtenidos del paciente COVID-19 número 8.

Además, otros aislamientos presentes en este segundo grupo de CRKP, el Kp108 y Kp037, aislados del paciente COVID-19 número 27 y del paciente sin COVID-19 número 10 respectivamente, se diferenciaban en la presencia y ausencia de unos pocos genes por un lado, Kp108 no presentaba *TEM-1* en su resistoma y era lo único que lo diferenciaba de los aislamientos Kp035, Kp050, Kp033 y Kp034; por otro lado, el resistoma de Kp037 era más similar al de los aislamientos Kp066 y K072 mencionados previamente, exceptuando por la ausencia de *SHV-28* y *KPC-3* en su genoma y porque era el único aislamiento que portaba *SHV-1* en este clado IV (Figura 4-5) (Anexo 7).



## 5. Discusión

Durante el periodo de pandemia por COVID-19 se presentó un aumento de la propagación intrahospitalaria de *Enterobacterias* productoras de carbapenemasas como *K. pneumoniae* (Tiri et al., 2020; Arcari et al., 2021; Amarsy et al., 2021; Gomez-Simmonds et al., 2020; García-Meniño et al., 2021; Arteaga-Livias et al., 2022). Esta CRKP fue la *Enterobacteria* productora de carbapenemasas aislada en la mayoría (80,8%) de los pacientes COVID-19 (Pintado et al., 2022). Aunque la prevalencia de las coinfecciones CRKP en estos pacientes varía de un estudio a otro, se reportó que esta fue entre 0,35% y 53% (Mędrzycka-Dabrowska et al., 2021). Por lo tanto, fue llevado a cabo un análisis descriptivo epidemiológico, genómico comparativo de los resistomas de CRKP aisladas durante el período de pandemia, tanto de pacientes COVID-19 como de pacientes sin COVID-19 circulantes en un hospital de tercer nivel de la ciudad de Bogotá D.C, Colombia.

De acuerdo con lo anterior, en el presente estudio se encontró que la incidencia de las infecciones CRKP en los pacientes COVID-19 fue más baja (35,9%) que la reportada en el otro grupo de pacientes sin COVID-19 (64,1%). A pesar de ello, la mortalidad por coinfecciones con CRKP en aquellos pacientes COVID-19 fue más alta (40%) que en el otro grupo de pacientes. Conforme a esto, diferentes estudios reportaron que los pacientes COVID-19 en estado crítico presentan complicaciones como sepsis cuando existen coinfecciones con CRKP y eso se asocia a la mortalidad de los pacientes afectados (Pintado et al., 2022; Mędrzycka-Dabrowska et al., 2021).

Existen algunos factores contribuyentes al establecimiento, colonización y desarrollo de infecciones con CRKP en pacientes con SARS-CoV2 positivo que conducen a los desenlaces fatales observados, de los cuales los más relevantes son: el estado inmunológico; las enfermedades de base como la enfermedad pulmonar y la encefalopatía;

la estancia prolongada intrahospitalaria, especialmente en UCI; el uso de tratamientos invasivos como el uso de catéteres, la ventilación mecánica y/o terapia de reemplazo renal; además, del uso de tratamientos previos con medicamentos como antibióticos y/o inmunomoduladores en estos pacientes (Gomez-Simmonds et al., 2020; García-Meniño et al., 2021; Mędrzycka-Dabrowska et al., 2021; Cataño-Correa et al., 2021).

Lo anterior concuerda con lo reportado en el presente estudio respecto a la estancia en UCI, factor contribuyente al desarrollo de las coinfecciones, ya que 78,6% de las CRKP se aislaron de pacientes COVID-19 que estaban hospitalizados en la UCI. No es extraño que esto suceda, pues *K. pneumoniae* se encuentra en una frecuencia de 17,4% en la UCI adultos, siendo reportado como el microorganismo más frecuentemente aislado (INS, 2019).

Aunque no analizamos algunos factores de los mencionados y discutidos en variedad de otros análisis epidemiológicos realizados durante la pandemia tales como las comorbilidades, el uso de tratamientos invasivos o medicamentos como inmunomoduladores, así como el uso de los tratamientos antibióticos combinados o la duración de estos tratamientos (Gomez-Simmonds et al., 2020; García-Meniño et al., 2021; Mędrzycka-Dabrowska et al., 2021; Cataño-Correa et al., 2021; Pintado et al., 2022) porque no hacían parte de los objetivos de nuestro trabajo, estos factores podrían estar asociados a la mortalidad en los pacientes COVID-19, lo que es probablemente es una limitación en del presente estudio, que otros autores podrían investigar más a fondo.

El hecho de que gran proporción (62%) de pacientes infectados con CRKP de nuestro estudio fueran mayores de 60 años y de que la mayoría de los pacientes COVID-19 fueran masculinos, concuerda con lo reportado en otros estudios realizados en pacientes COVID-19 coinfectados con CRKP (Gomez-Simmonds et al., 2020; Mędrzycka-Dabrowska et al., 2021; Cataño-Correa et al., 2021).

Se evidenció en este estudio que los pacientes COVID-19 eran mayores de 26 años, mientras algunos de los del grupo sin COVID-19 estaban por debajo de esta edad, lo que coincide con los primeros reportes realizados durante la pandemia, donde se reportó que los menores de 15 años no eran susceptibles de enfermarse a causa del virus del SARS-CoV2 (X. Zhu et al., 2020).

Por otra parte, en un estudio realizado en pacientes COVID-19 se observaron infecciones secundarias con *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, aisladas del tracto respiratorio en su mayoría (61,1%), seguidas de sangre (27,8%) y orina (11,1%) en menor frecuencia (Gomez-Simmonds et al., 2020). Otro estudio también concuerda con que el tracto respiratorio es donde se aislaron la mayoría de estos aislamientos (41,7%) (Amarsy et al., 2021). Por el contrario, en nuestro estudio las muestras del tracto respiratorio no fueron las principales de donde se aislaron las CRKP del grupo COVID-19, sino de hemocultivos (50%), quizás esto pudiera estar relacionado con un grado de compromiso mayor de estos pacientes.

Los anteriores hallazgos son importantes, dado que conociendo la epidemiología microbiológica relacionada con las infecciones de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos en pacientes con y sin COVID-19, suministrada por los datos sociodemográficos de este estudio y otros factores clínicos relacionados, se podrían tomar acciones de prevención y control de infección extras, dirigidas a ciertos grupos poblacionales a fin de reducir las cargas de morbimortalidad de los pacientes afectados más aún en momentos tan cruciales como una pandemia.

Estudios sugieren que los patrones de susceptibilidad antimicrobiana, presentes en *K. pneumoniae* aisladas de pacientes COVID-19 durante la pandemia, comparado con los patrones de susceptibilidad presentes en *K. pneumoniae* conocidos de años previos, han disminuido frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos como: piperacilina/tazobactam, cefepima, ceftriazona, cefotaxima meropenem, imipenem y aztreonam; además, frente a otros antibióticos como ciprofloxacina, gentamicina, tobramicina, amikacina; (Nori et al., 2020; Saini et al., 2021). Nuestro estudio confirmó que las tasas de resistencia frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos testeados fueron altas en los aislamientos CRKP, destacándose una diferencia en los dos grupos de CRKP en lo que respecta a la tasa de resistencia frente a cefoxitina, más alta (92,9%) en los aislamientos CRKP obtenidos de pacientes COVID-19 (Tabla 4-4).

Sin embargo, nuestro estudio no concuerda con lo que los anteriores estudios reportaron en lo que respecta a las tasas de resistencia frente a amikacina, pues estas fueron las tasas de resistencia más bajas presentes en los aislamientos de pacientes COVID-19 y sin COVID-19, 14% y 4% respectivamente, aunque estas tasas muestran un aumento

discreto en la resistencia en los aislamientos CRKP provenientes de paciente COVID-19, posiblemente debido a las diferencias en los tratamientos de antibióticos utilizados.

Tal y como lo indicaron otros estudios ya mencionados anteriormente (Nori et al., 2020; Saini et al., 2021) y aquel donde se reportó una resistencia del (100%) presente en las CRKP aisladas de pacientes COVID-19 frente a trimetoprim-sulfametoxazol (Howard-Jones et al., 2022); nuestro estudio también confirmó que se presentaron altas tasas de resistencia en los dos grupos de aislamientos de CRKP frente a ciprofloxacina y trimetoprim-sulfametoxazol, aunque estas tasas de resistencia fueron más altas en las CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 (ciprofloxacina 80% y trimetoprim-sulfametoxazol 72%), que en las CRKP aisladas de pacientes COVID-19 (ciprofloxacina 57,1% y trimetoprim-sulfametoxazol 50%).

Una de las posibles causas de esta resistencia aumentada observada durante la pandemia por COVID-19 que proponen los autores fueron el uso indiscriminado de antibióticos, puesto que en los hospitales fueron administrados antibióticos en una alta proporción de pacientes, mencionan específicamente que de un 70-72% de pacientes COVID-19 los recibieron (Mędrzycka-Dabrowska et al., 2021; Ghosh et al., 2021). Dentro de los antibióticos más prescritos durante la pandemia estuvieron: piperacilina/tazobactam, amoxicilina/ácido clavulánico, meropenem, ciprofloxacina, ceftazidima, ceftriazona, cefepime, clindamicina, vancomicina, metronidazol, hidroxiclороquina, azitromicina (Howard-Jones et al., 2022; Gomez-Simmonds et al., 2020; García-Meniño et al., 2021; Arteaga-Livias et al., 2022); quizás debido a que en infecciones pasadas por (SARS) CoV, (MERS) CoV y AH1N1, se usaron antibióticos también de manera preventiva o como tratamiento (Manohar et al., 2020).

En nuestro estudio, el hecho de que fueron administrados previamente al establecimiento de la infección por CRKP, principalmente  $\beta$ -lactámicos de amplio espectro como: ampicilina/sulbactam, cefepime, piperacilina/tazobactam y meropenem se puede relacionar con las altas tasas de resistencia observadas frente a estos antibióticos en los dos grupos de CRKP (Tabla 4-5), ya que como es conocido, el uso de antibióticos puede conllevar a la generación de una presión selectiva en las bacterias expuestas a ellos (Ghosh et al., 2021). En este caso, la administración de estos  $\beta$ -lactámicos mencionados, previamente al aislamiento de las CRKP, pudieron incidir en que se presentara una presión

selectiva en las CRKP, las cuales seleccionaron mecanismos de resistencia como por ejemplo la inactivación de antibióticos mediada por genes productores de enzimas BLEEs y carbapenemasas principalmente, lo que en consecuencia les confirió a estos aislamientos altas tasas de resistencia frente a esta clase de antibióticos (Tabla 4-4) (Tabla 4-5) y (Tabla 4-6).

En relación con lo anterior, en el presente estudio se encontró que *TEM-1* y *SHV-28* estaban presentes más frecuentemente en los genomas de las CRKP aisladas de pacientes COVID-19; similar, en otro estudio, los aislamientos de *K. pneumoniae* obtenidos de pacientes COVID-19 también albergaban *TEM-1A* (Arcari et al., 2021). Por el contrario, en nuestro estudio *CTX-M-15* fue el gen asociado a BLEEs más distribuido en aislamientos de pacientes sin COVID-19, además, únicamente en este grupo de aislamientos se encontró *LEN-17*, reportado presente en *K. pneumoniae* desde la era pre-KPC en Colombia (Rojas et al., 2018). Estos hallazgos confirman lo reportado en la literatura, ya que CTXM-15, TEM y SHV, son las BLEEs más comúnmente asociadas al mecanismo de inactivación de  $\beta$ -lactámicos, presentes en *K. pneumoniae* (De Angelis et al., 2020).

Específicamente, las BLEEs mencionadas anteriormente son enzimas que han expandido su espectro de acción relacionadas no solo con la hidrólisis de penicilinas, sino también de cefalosporinas de tercera generación y monobactámicos; sin embargo, estas enzimas son inhibidas por inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como el ácido clavulánico y el sulbactam (Bush & Jacoby, 2010). Es preocupante el hecho de que casi todas las CRKP de los dos grupos de nuestro estudio eran resistentes a piperacilina/tazobactam, que es otro inhibidor de  $\beta$ -lactamasas además de los mencionados; así como también preocupa que la mayoría de las CRKP aisladas de pacientes COVID-19 y un poco más de la mitad del grupo sin COVID-19 presentaban tasas de resistencia alta frente a cefoxitina (Tabla 4-4), lo cual se relaciona con que los genes encontrados en los diferentes aislamientos en nuestro estudio están asociados a BLEEs, que a su vez han sido reportadas también como activas frente a cefoxitina (Wilson & Török, 2018; Bush & Jacoby, 2010).

En relación con la distribución de otros genes, con capacidad más amplia de resistencia frente a los  $\beta$ -lactámicos de último recurso como los carbapenémicos, se observó en la mayoría de los paciente que fueron tratados previamente con estos antibióticos y que se presentaron altas tasas de resistencia antimicrobiana en los dos grupos de CRKP de

nuestro estudio como se indicó anteriormente; es así como la mayoría (86%) de los aislamientos obtenidos de pacientes COVID-19 y de pacientes sin COVID-19 (56%) mostraron la presencia del gen *KPC-3*; esto se correlaciona con el hecho histórico de que en Colombia, el gen *KPC-3* es más predominante que el gen *KPC-2* en aislamientos de *K. pneumoniae* tipificados como ST258 (Rojas et al., 2018). Aunque en otro estudio, realizado en New York, en CRKP aisladas de pacientes COVID-19, fue el gen *KPC-2* el que se encontró más distribuido en estos aislamientos, quizás debido a la endemicidad conocida de estos genes *KPC* en Estados Unidos (Gomez-Simmonds et al., 2020), lo cual indica que esta clase de resistencia no es precipitada por la acción de la coinfección de SARS-CoV-2 con CRKP, sino que es un mecanismo de resistencia muy conocido en este tipo de bacterias.

Según los datos más recientes aportados por el INS, la coproducción de carbapenemasas KPC+NDM es la más común encontrada en *Enterobacterias*; pero también se han reportado otras: KPC+VIM, KPC+GES, GES+NDM, NDM+VIM y KPC+OXA-23 (INS, 2019). Esto se correlaciona con que *KPC-3* y *NDM-1* fueron observadas en la Kp096, obtenida de un paciente COVID-19, en nuestro estudio. Sin embargo, en otros estudios realizados en las CRKP aisladas de pacientes COVID-19 no se reportaron estas coproducciones y solo se presentó un gen asociado a la resistencia a carbapenémicos en cada uno de los aislamientos CRKP (Gomez-Simmonds et al., 2020; Arcari et al., 2021; Amarsy et al., 2021), lo cual también reviste importancia para la salud pública e indica que estas coproducciones son algo que se puede encontrar en este tipo de aislamientos y no es suscitado por la presencia del SARS-CoV-2 en pacientes coinfectados con CRKP exclusivamente.

Cabe resaltar que, en Colombia no ha sido reportado en *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas la coexpresión de *NDM-1*, *KPC-3*, *OXA-2*, *GES-2* en un mismo aislamiento, tal y como se reportó en la Kp082 aislada de paciente sin COVID-19 en nuestro estudio. Esta característica de coproducciones y coexpresiones es muy importante porque les proporciona a los aislamientos una capacidad ampliada de resistencia frente a los carbapenémicos, dejando limitadas opciones de tratamiento (García-Betancur et al., 2021). Por tanto, estas coproducciones de genes asociados a resistencia son algo que hay que tener en cuenta y bajo vigilancia epidemiológica en nuestro país.

Muchos autores destacan que la epidemiología molecular de las CRKP podría estar cambiando a raíz de la pandemia por COVID-19; como en Portugal donde se hallaron CRKP de linaje ST11 con *NDM-1*, algo que no era endémico en ese país (Mendes et al., 2022); y en Perú, donde se reportó *NDM* en *K. pneumoniae* en un hospital donde nunca antes se había reportado (Arteaga-Livias et al., 2022). En nuestro caso la anterior coexpresión mencionada podría estar relacionada con un cambio sutil que este surgiendo en la epidemiología molecular presente en las CRKP del hospital.

Por otra parte, se ha visto que las mutaciones en los genes que codifican las porinas junto a la sobreexpresión de otras  $\beta$ -lactamasas en la misma bacteria, son en muchos casos los causantes de la resistencia fenotípica observada a carbapenémicos en aislamientos en los que no se encuentra un gen asociado a producción de carbapenemasas (Founou et al., 2019; Lomonaco et al., 2018; Wilson & Török, 2018; Saavedra et al., 2021).

De hecho, lo anterior podría explicar porque en nuestro estudio se encontraron los aislamientos Kp024 y Kp037 pertenecientes a pacientes sin COVID-19, resistentes a carbapenémicos, con ausencia de genes asociados a la producción de carbapenemasas, pero que presentaban *OmpK37* y otros genes asociados a BLEEs como *ampH*, *LEN-17* y *SHV-1* en la Kp024; además de *ampH*, *SHV-1* y *TEM-1* en la Kp037. Este comportamiento no está asociado directamente con la presencia de COVID-19 en pacientes coinfectados con CRKP según lo reportado en la literatura, puesto que, si bien encontramos CRKP aisladas de pacientes COVID-19 en las que se reportaron otras porinas diferentes de *ompK37*, como las *ompK35/ompK36*, que también se encargan de mediar la resistencia a carbapenémicos (Howard-Jones et al., 2022); además, encontramos un reporte previo a nivel nacional de aislamientos de *K. pneumoniae* fenotípicamente resistentes a carbapenémicos, con ausencia de genes codificadores de carbapenemasas y con presencia de BLEEs como CTX-M-15, SHV-11, OXA-1 y TEM-1D (Saavedra et al., 2021).

Es de resaltar que, un estudio realizado específicamente durante la pandemia excluyó los aislamientos que no presentaron genes de resistencia a carbapenémicos (Gomez-Simmonds et al., 2020), sin embargo, en este estudio decidimos incluirlos, dado que los casos anteriormente expuestos, reflejan la importancia de tener en cuenta este tipo de hallazgos presentes en el resistoma en general de las CRKP circulantes comúnmente en

los hospitales, relacionados con la resistencia hacia estos antibióticos de última línea de tratamiento.

Por otra parte, los datos recolectados en este estudio revelaron que habían genes relacionados a la inactivación de antibióticos con distribuciones variables en los dos grupos de CRKP asociados con la resistencia a otros antibióticos como los aminoglucósidos, fenicoles, rifamicinas, macrólidos, glicopéptido e incluso fluoroquinolonas. Siendo la distribución de genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos en los dos grupos de CRKP la más variada (Tabla 4-7). Otros estudios reportan la diversidad de genes que producen enzimas inactivantes de aminoglucósidos, tales como: *AAC(6')-Ib-cr aacA4*, *aadA1*, *aac(3)-I*, presentes en aislamientos obtenidos previamente a la pandemia (Krapp et al., 2017), y *aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-I*, *aph(3')-VI*, *aph(6')-I*, *aac(6')-Ib3*, *aac(3)-IIa*, *aadA1*, genes presentes en CRKP aisladas de pacientes COVID-19 (Arcari et al., 2021; Amarsy et al., 2021). Lo cual indica que las CRKP aisladas de pacientes COVID-19 poseen tal diversidad de genes asociados a la resistencia a aminoglucósidos al igual que las CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19.

Destacamos el hallazgo de *APH(3')-VI* que únicamente se encontró en algunas CRKP aisladas de pacientes COVID-19 en nuestro estudio. Se ha demostrado como *aph(3')-VIa* estaba presente en el plásmido IncQ1Via del aislamiento ST395-*bla*OXA-48, obtenido de un paciente COVID-19, lo que fue asociado a la resistencia fenotípica observada en este aislamiento frente a amikacina (Shelenkov et al., 2022). Esta distribución en el presente estudio se relaciona con que algunas de las CRKP aisladas de pacientes COVID-19 en el presente estudio eran más resistentes frente a amikacina que las CRKP del otro grupo (Tabla 4-4) posiblemente a causa de la diversidad de CRKP circulantes en el hospital.

Por el contrario, el gen *BRP(MBL)*, asociado a la resistencia a la bleomicina (Dortet et al., 2017), solo se encontró en nuestro estudio en una CRKP aislada de un paciente sin COVID-19, en la que además se halló en el resistoma *NDM-1*. El gen *BRP(MBL)* se ha hallado presente en aislamientos de *K. pneumoniae*, obtenidos durante la pandemia en el 2020, junto a *NDM-1* en un transposón Tn125-like (Mendes et al., 2022). Este caso y el anterior del gen asociado a la resistencia a aminoglucósidos, reflejan la importancia de la diseminación de estos genes a través de la transferencia horizontal y además subraya que las variaciones en estos genes asociados a la resistencia a otros antibióticos se



presentaron en los dos grupos de CRKP, lo cual no es exclusivo de las CRKP aisladas de pacientes COVID-19, posiblemente relacionado con el tratamiento previamente administrado.

Por otro lado, con referencia a que se encontró que habían genes asociados a bombas de eflujo presentes en las 39 CRKP de nuestro estudio como: *LptD*, *KpnH*, *KpnG*, *KpnF*, *KpnE*, *H-NS*, *CRP*, *baeR*, *emrR*, *adeF*, *rsmA*, *msbA*; que les conferirían resistencia múltiple a estos aislamientos, podemos decir que las bombas de eflujo son un componente importante de resistencia a múltiples clases de antibióticos, que dota a cualquier clase de *K. pneumoniae* que las exprese de la capacidad de MDR e incluso de XDR. Es así como las bombas de eflujo *KpnH*, *KpnG*, *KpnF*, *KpnE*, *OqxA* y *OqxB*, han sido las más reportadas en *K. pneumoniae* (Pulzova et al., 2017; Krapp et al., 2017); además, genes como *oqxA* y *oqxB* se han hallado en el resistoma de CRKP aisladas de pacientes COVID-19 (Amarsy et al., 2021), y se han asociado a la resistencia a desinfectantes y detergentes (Li et al., 2019).

En el presente trabajo se identificaron los genes *oqxB* y *qacEdelta1*, en baja proporción en los dos grupos de CRKP; por el contrario, el *oqxA* se encontró en más del 91% de los aislamientos de los dos grupos de CRKP del estudio, al igual que *marA*, otro gen asociado a la resistencia a varias clases de antibióticos y al triclosán (Tabla 4-8). Es interesante saber que se han reportado anterior a la pandemia *K. pneumoniae* expuestas a biocidas y a ciprofloxacina, lo cual se relaciona con mutantes que favorecen la presión selectiva como la expresión alta de bombas de eflujo y de reguladores como *marA* (Curiao et al., 2015).

Se sabe que en el periodo de la pandemia, tanto en los hospitales como a nivel comunitario se hizo alto uso de antisépticos, desinfectantes y biocidas (Ghosh et al., 2021) con el fin de llevar a cabo los protocolos de limpieza y desinfección y como medidas de autocuidado para prevenir la diseminación del COVID-19; sin embargo, estas bacterias también están expuestas a constante presión selectiva a estos agentes en la cotidianidad del medio intrahospitalario, lo cual demuestra que es imprescindible investigar nuevos medicamentos para afrontar la problemática de la resistencia antimicrobiana que también tiene que ver con el uso de biocidas y desinfectantes.

En el presente estudio además se reportó una distribución variable de genes asociados al mecanismo de modificación de antibiótico (Tabla 4-9). Destacamos que en frecuencia alta

en los dos grupos de CRKP del estudio se halló *EF-Tu*, asociado a la resistencia a elfamicina, un medicamento en estudio (Prezioso et al., 2017), y aunque este gen no se reportó en otros estudios en aislamientos CRKP obtenidos durante la pandemia, el hallazgo de este gen en el presente estudio en las CRKP aisladas de pacientes con y sin COVID-19 en similar proporción, demuestra que la resistencia de las CRKP está ampliada en la actualidad, incluso frente a los nuevos medicamentos aún en desarrollo, dejando pocas opciones terapéuticas.

Estudios realizados durante la pandemia han reportado que *qnrB*, *parC* y *gyrA* mutados; son los genes más reportados en CRKP aisladas de pacientes con y sin COVID-19, asociados a el mecanismo de modificación de antibiótico y la resistencia a fluoroquinolonas (Amarsy et al., 2021; Mendes et al., 2022). En relación con esto, en nuestro estudio, a pesar de que se encontró que *parC* y *gyrA*, estaban presentes en baja frecuencia en los dos grupos de CRKP; la distribución de *QnrB1* fue más amplia, presente en (44%) de las CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 y en (29%) de las CRKP aisladas de pacientes COVID-19, además, *QnrB6* solo fue hallado en las primeras CRKP (Tabla 4-9), lo cual, se relaciona con las tasas más altas de resistencia observadas en las CRKP del grupo sin COVID-19 que en el otro grupo, posiblemente asociado al tratamiento antibiótico previo administrado (Tabla 4-4).

Por otro lado, *dfr14*, *dfrA27* y *dfrA12*; asociados al mecanismo de modificación de antibiótico y con la resistencia a trimetoprim, se hallan comúnmente en el resistoma de *K. pneumoniae* (Saavedra et al., 2021); el gen *dfr14* incluso estaba presente en CRKP aisladas de pacientes COVID-19 durante la pandemia (Amarsy et al., 2021; Arcari et al., 2021). Se resalta que la distribución de genes asociados a la resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol en nuestro trabajo puede deberse a que previamente en el caso del 12% de aislamientos CKRP les fue administrado trimetoprim/sulfametoxazol a sus correspondientes pacientes sin COVID-19 (Tabla 4-5).

Con relación a lo anterior, en el presente estudio *dfrA27* y *dfrA6* fueron aislados únicamente en las CRKP del grupo sin COVID-19, mientras que *dfr14* estaba más distribuido en el grupo de CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19 que en el otro grupo de aislamientos (Tabla 4-9). Similar a esta última distribución se hallaron los genes *sul2*, asociados con la resistencia a sulfonamidas. En general los genes *sul* estaban presentes en CRKP aisladas

durante la pandemia (Amarsy et al., 2021). Aunque comúnmente presentes en los aislamientos CRKP son hallados específicamente *sul2* y *sul1* (Krapp et al., 2017).

En lo que se refiere al análisis epidemiológico y genómico de los 39 aislamientos del presente estudio, este reveló que habían 14 STs, de los cuales 2 STs eran nuevos. Además, que el ST1082, fue el secuenciotipo donde se asignaron 17 de las CRKP del estudio, aisladas tanto de pacientes COVID-19 como de pacientes sin COVID-19. El ST1082 es un secuenciotipo poco frecuente asignado a CRKP, se ha hallado en una *K. pneumoniae* aislada de un paciente con infecciones necrotizantes de la piel y los tejidos blandos (Krapp et al., 2017), por lo cual es importante hacer vigilancia genómica y epidemiológica a estos STs en el país.

Se destacó que el segundo ST, asignado a los dos grupos de CRKP de nuestro estudio, fue el ST258; este ST es perteneciente al complejo clonal CG258, se asocia a IAAS y ha sido reportado en (208/425) aislamientos recolectados entre 2013 y 2017 en Colombia (Saavedra et al., 2021) y en CRKP aisladas de pacientes COVID-19 durante un período de la pandemia en New York (Gomez-Simmonds et al., 2020).

Otros STs que fueron descritos en nuestro estudio en menor frecuencia fueron el ST236 y ST17, asociados a CRKP aisladas de pacientes sin COVID-19, al igual que los singletons: ST1563, ST392, ST37, ST244, ST412; es de destacar que ST17, ST392 y ST37 se han reportado previamente en Colombia (Saavedra et al., 2021). Sin embargo, ST236-KPC se ha aislado en CRKP en Israel (Adler et al., 2015); ST244 ha sido obtenido de un aislamiento de un paciente en Finlandia en el año 2010 que fue un caso referido como importado de España (Österblad et al., 2012); ST412 se ha reportado en un aislamiento en Taiwán sin la presencia de genes que le confirieran resistencia a carbapenemasas (Lee et al., 2021) y ST1563 se ha aislado en *K. pneumoniae* con resistencia a colistina (Kieffer et al., 2017). Esto denota la expansión y diseminación geográfica de estos grupos clonales diversos circulantes en el mundo y también en los hospitales del país como en el hospital analizado, algo que sucede constantemente y que permite la evolución de estos grupos clonales y su intercambio genético.

En lo que respecta a STs únicos asignados a CRKP aislados de pacientes COVID-19, estos fueron ST14, ST307 y ST219, todos se han reportado en CRKP en Colombia

previamente (Saavedra et al., 2021). Sin embargo, en otros estudios las CRKP aisladas de pacientes COVID-19 se han tipificado como ST15, ST101, ST258, ST70 (Arcari et al., 2021; Amarsy et al., 2021; Gomez-Simmonds et al., 2020). Estos hallazgos revelan la heterogeneidad de los linajes encontrados en nuestro estudio, relacionados con la diversidad de clones circulantes en el hospital durante el periodo de pandemia seleccionado, lo cual no es algo que se deba a la presencia de la coinfección SARS-CoV-2 con CRKP específicamente en este grupo de pacientes.

Por otra parte, el agrupamiento del árbol de máxima verosimilitud, basado en la alineación de los SNPs del core de los 39 CRKP, concuerda en su gran mayoría con la diversidad genética de los secuenciotipos MLST presentes en nuestro estudio. Los cuatro clados principales: I, II, III y IV, tenían un tipo en particular de MLST en cada clado. Sin embargo, el clado III incluyó un aislamiento asignado a un ST no reportado en la base de datos MLST, mientras que el resto fueron tipificados como ST236 (Figura 4-5); lo que muestra la mayor capacidad de resolución al utilizar la información del genoma completo a través de los SNPs que la del MLST como era de esperarse, ya que el ST no reportado podría considerarse como no asociado a las demás CRKP ST236 del clado III, en caso de utilizarse solamente MLST para la tipificación, dando una información errada en términos de las relaciones de clonalidad entre los diferentes aislamientos y dificultando el seguimiento preciso de la diseminación de los diferentes clones en el hospital.

Además, se resaltó que el clado II, III y IV fueron de distribución clonal, debido a que sus correspondientes CRKP estaban cercanamente relacionadas dada la distancia de menos de 50 SNPs entre ellas. Se resalta como el clado II presentó aislamientos provenientes de pacientes sin COVID-19, mientras que los clados I, III y IV tenían CRKP aisladas de los dos grupos de pacientes del estudio. Esta diversidad genética de las CRKP hallada en nuestro estudio, concuerda con otro estudio realizado durante la pandemia en Italia, entre marzo y mayo del 2020, donde se encontró que las CRKP aisladas de pacientes COVID-19 en los hospitales no se constituyen un linaje aparte de las otras aisladas de pacientes sin COVID-19 (Arcari et al., 2021).

Específicamente, en nuestro estudio en el clado IV las CRKP se asignaron al ST1082, este además de ser el clado donde se agruparon más aislamientos CRKP de los dos grupos de estudio 43,6%, fue el que más permaneció durante periodo seleccionado por el estudio

con aislamientos circulando desde marzo del 2020 hasta junio del 2021. Lo anterior tiene relación con lo observado en otro estudio, donde *K. pneumoniae* ST258 aisladas de pacientes COVID-19, entre marzo y abril del 2020 en New York, conformaban 4 linajes diferentes relacionados genéticamente con otros aislados ST258 obtenidos en un período previo a la pandemia (Gomez-Simmonds et al., 2020). Lo cual indica que algunas de las CRKP aisladas de pacientes COVID-19 tienen relación con otros aislamientos circulantes en los hospitales obtenidos de diversidad de pacientes.

Estos hallazgos refuerzan la importancia de la vigilancia genómica basada en WGS, para revelar la emergencia de linajes y clones epidemiológicos que se diseminan en el tiempo, herramienta que viene convirtiéndose en un gold estándar a nivel hospitalario para hacer seguimiento y control de brotes (Hernández et al., 2020).

Por otra parte, el hecho de que los pacientes sin COVID-19 identificados como 7 y 19, así como el paciente COVID-19 identificado como 8, tenían algunos de sus aislamientos *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos ubicados en diferentes clados, con diferentes genes de resistencia (Figura 4-5), implica posiblemente un riesgo para el pronóstico, tratamiento y la evolución de estos pacientes durante su hospitalización, debido a que esto muestra que los pacientes estuvieron infectados con dos tipos diferentes de CRKP. Esto parece ser un caso recurrente y no exclusivamente suscitado por el COVID-19, ya que lo mismo fue reportado en varios estudios durante la pandemia tanto en pacientes sin COVID-19, como en pacientes COVID-19 (Mendes et al., 2022; Gomez-Simmonds et al., 2020). Lo anterior aumenta la importancia de realizar varios screening de todos los pacientes que ya están infectados, en la práctica clínica rutinaria, en búsqueda de infecciones por múltiples de CRKP.

En relación con la distribución de los genes de resistencia presentes en los diversos linajes CRKP, se evidenció que había una gran variabilidad de los mismos (Figura 4-5); incluso dentro de los mismos clados las CRKP que los conformaban no portaban los mismos genes de resistencia. Es así como en el clado IV, aunque habían genes presentes en el 100% de sus aislamientos que mediaban la resistencia a diversas clases de antibióticos; también se destaca que habían 16 genes que variaban porque no se encontraron presentes en todas las CRKP de este clado como: *CTX-M-15*, *OXA-1*, *SHV-1*, *SHV-28*, *TEM-1*, *KPC-3*, *EF-Tu*, *QnrB1*, *marA*, *APH(6)-Id*, *AAC(6')-Ib-cr*, *dfrA14*, *sul2*, *catI*, *tet(A)*,

*tet(D)*). Incluso parecían haber dos grupos de CRKP con genes asociados a resistencia distintos (Figura 4-5). Algo similar se encontró en un estudio donde se menciona la variación dentro de un mismo grupo clonal, conformado por CRKP aisladas de pacientes COVID-19, del gen *CTX-M-15* presente en unas CRKP y ausente en otras (Arcari et al., 2021).

Esta variación dentro de un mismo clado del resistoma presente en las CRKP se relacionó con la adquisición o pérdida de genes de resistencia favorecida por la transferencia horizontal de genes, puesto que el 81% de los genes que variaban estaban ubicados en plásmidos en casi todas las CRKP donde se hallaron. La transferencia horizontal de genes por medio de elementos genéticos móviles conducen a la diseminación de genes de resistencia en *K. pneumoniae* (Pitout et al., 2015). Tal es el caso de genes como los *KPC* que comúnmente se encuentran junto a elementos transponibles como el *Tn4401b* asociado a plásmidos (Rojas et al., 2018) tales como *IncFIB(K)*, *IncFII(K)*, *ColRNAI*, *IncR* y *IncFII*.

Similar, un estudio realizado durante la pandemia entre agosto y diciembre del 2020, en un hospital de Portugal, reveló mediante WGS, la presencia de un brote causado por CRKP-ST11, cuyo análisis plasmídico demostró que el gen *NDM-1* que albergaban estos aislamientos se encontraba junto a elementos genéticos móviles como la secuencia de inserción *IS30* y hacía parte de un transposón *Tn125-like* (Mendes et al., 2022). De manera que entonces, es la presencia de todos estos elementos genéticos móviles en los diversos aislamientos clínicos en gran medida lo que propicia la capacidad de transferencia de genes de resistencia entre distintos clones, facilitando así su expansión internacional.

Los hallazgos anteriores resaltan la importancia de los elementos genéticos móviles como las principales plataformas de diseminación de variedad de genes de resistencia y los responsables de la endemidad de aislamientos CRKP causantes del aumento de la AMR, un fenómeno que no es exclusivo de la pandemia ni de solo los CRKP aislados de pacientes con y sin COVID-19 en ese periodo, sino que está presente desde hace mucho tiempo en diversidad de aislamientos CRKP intrahospitalarios.

## 6. Conclusiones y Recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

Se encontraron tasas de resistencia altas frente a  $\beta$ -lactámicos similares en los aislamientos obtenidos de los dos grupos pacientes, con excepción de la resistencia frente a cefoxitina, más alta en aislamientos de pacientes COVID-19, y de ciprofloxacina y trimetoprim/sulfametoxazol, más alta en aislamientos de pacientes sin COVID-19, correlacionadas con la distribución de los genes de resistencia y la administración previa de antibióticos  $\beta$ -lactámicos y trimetoprim/sulfametoxazol.

En general no se observaron diferencias en comportamiento en la distribución de genes pertenecientes a los diferentes mecanismos de resistencia entre los dos grupos de aislamientos, aunque debido alto número de tipos encontrados, se observaron genes presentes únicamente en algunos aislamientos de pacientes COVID-19, como: *tet(B)*; *APH(3')-VI*; *ErmB*; *QnrS1* y *dfrA12*; y únicamente en aislamientos de pacientes sin COVID-19, como: *AAC(6')-Ib10*, *aadA16*, *BRP(MBL)*, *LEN-17*, *GES-2*, *QnrB6*, *dfrA6*, *dfrA27*.

El árbol filogenético indica una alta variabilidad genética en los aislamientos estudiados, dentro de los que se identificaron 14 secuencias de tipos, 2 de los cuales no habían sido reportados previamente, siendo el ST1082, un ST poco frecuente en Colombia donde se distribuyeron buena proporción de los dos grupos de aislamientos del estudio.

La presencia dentro de los grupos clonales III y IV identificados en el árbol filogenético con genomas de aislamientos obtenidos de pacientes con o sin COVID-19, indica que la coinfección con SARS-CoV-2 no está asociada a un tipo de CRKP en particular, sino posiblemente a los tipos que estén circulando en el ambiente donde se realiza la atención de los pacientes.

Se observó la coexistencia de los genes *NDM-1*, *GES-2*, *OXA-2* y *KPC-3* en el aislamiento Kp096, obtenido de un paciente sin COVID-19, combinación de genes no reportada hasta el momento.

Se observaron variaciones en los resistomas de aislamientos con relaciones clonales cercanas (> 50 SNPs de diferencia), indicativas de que la fuerte presión selectiva hace que la bacteria rápidamente adquiera nuevos elementos genómicos asociados a mecanismos de resistencia, posiblemente a través transferencia horizontal de genes.

## 6.2 Recomendaciones

Es importante implementar la aplicación de técnicas como WGS en los laboratorios de microbiología que permitan obtener en tiempo real el genoma de las CRKP circulantes en los hospitales en especial en escenarios tan complejos como el desarrollo de una pandemia.

Se debe hacer énfasis de manera preventiva y sistemática en fortalecer los PROA así como los protocolos de prevención y control de infecciones dirigido a evitar la diseminación de CRKP en pacientes hospitalizados más aún durante una pandemia.

Sería importante estudiar estudiar las CRKP hipervirulentas que podrían causar posibles coinfecciones lo que tendría implicaciones en el desenlace fatal de los pacientes COVID-19.

Sería interesante analizar muestras tomadas en otros hospitales y comparar el comportamiento genómico y epidemiológico de las CRKP de nuestro estudio con el de esas otras CRKP.



## Anexos: Tablas y Figuras

### 1. Datos epidemiológicos y clínicos de los pacientes COVID-19 y pacientes sin COVID-19 con sus respectivos aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos

Pacientes COVID-19	Edad (Sexo)	Fecha de Ingreso al Hospital	Código del aislamiento en el IBUN	Tipo de Muestra	Servicio	Fecha del aislamiento	Desenlace
5	74 (M)	13/06/2020	Kp026	HEMO 3	UCI 22	27/06/2020	fallecido
6	74 (M)	18/06/2020	Kp027	HEMO 1	UCI 32	3/07/2020	fallecido
8	61 (F)	6/09/2020	Kp032	HEMO 3	UCI 25	15/09/2020	vivo
			Kp033	HEMO 1	UCI 25	15/09/2020	
			Kp034	SOT	UCI 25	17/09/2020	
12	65 (F)	13/11/2020	Kp048	URO	UCI 1 cama 31	24/11/2020	fallecido
15	47 (M)	27/10/2020	Kp061	tejido seno etmoidal y maxilar derecho	Hospitalización 447	7/12/2020	vivo
			Kp062	tejido seno etmoidal y maxilar izquierdo	Hospitalización 447	7/12/2020	
17	77 (M)	1/02/2021	Kp066	SOT	UCI 1 cama 25	17/02/2021	vivo
			Kp072	punta de catéter	UCI 1 cama25	20/02/2021	
18	52 (F)	20/01/2021	Kp096	HEMO2	Hospitalización 351	18/04/2021	vivo
27	50 (M)	8/05/2021	Kp108	HEMO 1	UCI 3 cama 208 B	9/06/2021	vivo
28	56 (M)	7/07/2021	Kp119	HEMO 2	UCI 1 cama 1	11/07/2021	vivo
29	65 (M)	10/07/2021	Kp120	URO	UCI 1 cama6	12/07/2021	fallecido

Sexo: (M): masculino; (F): femenino. Fecha: día/mes/año. Tipo de Muestra: HEMO 1,2,3: número del hemocultivo, URO: urocultivo, SOT: secreción orotraqueal. UCI: servicio UCI.

## Anexo 1: (Continuación)

Pacientes sin COVID-19	Edad (Sexo)	Fecha de Ingreso al Hospital	Código del aislamiento en el IBUN	Tipo de Muestra	Servicio	Fecha del Aislamiento	Desenlace
1	34 (M)	2/01/2020	Kp021	Hueso sacro	Hospitalización 332	23/03/2020	vivo
2	71 (M)	26/02/2020	Kp018	secreción columna	Hospitalización 212	12/04/2020	vivo
			Kp019	secreción columna	Hospitalización 212	16/04/2020	
			Kp017	hueso vertebral	UCI6	18/04/2020	
			Kp024	URO	UCI26	1/06/2020	
3	76 (M)	30/05/2020	Kp025	URO	Hospitalización 333	13/06/2020	fallecido
4	96 (M)	11/06/2020	Kp029	HEMO 3	Hospitalización 305A	26/07/2020	vivo
7	75 (F)	5/07/2020	Kp030	HEMO 2	Hospitalización 305A	26/07/2020	vivo
			Kp031	HEMO 2	Hospitalización 349	30/07/2020	
			Kp035	HEMO 3	Hospitalización 354	24/10/2020	
9	76 (F)	21/10/2020	Kp037	SOT	UCI 18	24/10/2020	fallecido
10	25 (F)	23/10/2020	Kp039	URO	Hospitalización 435	6/11/2020	fallecido
11	75 (M)	1/11/2020	Kp050	URO	UCI 2 cama14	30/11/2020	vivo
13	70 (F)	28/11/2020	Kp052	URO	Hospitalización 453	2/12/2020	vivo
			Kp053	HEMO 3	Hospitalización 453	30/11/2020	
			Kp065	URO	UCI 1 cama 3	27/02/2021	
14	51 (M)	8/11/2020	Kp080	URO	UCI 3 cama 216	27/01/2021	fallecido
16	61 (F)	24/02/2021	Kp082	URO	UCI 3 cama 216	13/03/2021	vivo
19	23 (M)	25/12/2020	Kp078	líquido peritoneal	UCI 1 cama 1	9/02/2021	fallecido
20	51 (F)	5/02/2021	Kp089	drenaje biliar	UCI 1 cama 2	23/03/2021	vivo
21	66 (F)	5/03/2021	Kp091	SOT	UCI 2 cama 5	11/03/2021	vivo
22	61 (M)	22/02/2021	Kp101	secreción hallux derecho	Hospitalización 350	27/03/2021	vivo
23	51 (F)	21/03/2021	Kp103	URO	Hospitalización 405B	21/04/2021	vivo
24	76 (F)	9/03/2021	Kp104	URO	Servicio de cuidado renal	17/05/2021	vivo
25	71 (F)	17/05/2021	Kp105	líquido peritoneal	UCI 4 cama 205 B	13/06/2021	vivo
26	42(M)	28/04/2021		SOT			vivo

Sexo: (M): masculino; (F): femenino. Fecha: día/mes/año. Tipo de Muestra: HEMO 1,2,3: número del hemocultivo, URO: urocultivo, SOT: secreción orotraqueal. UCI: servicio UCI.

## 2. Identificación bioquímica de los 39 aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos

Número de Paciente	Código de las CRKP en el IBUN	Pruebas bioquímicas							
		TSI			Urea	Citrato	SIM		
		Fermentación de carbohidratos	Producción de Gas	Producción de H <sub>2</sub> S			H <sub>2</sub> S	Indol	Movilidad
1	Kp021	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Kp018	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Kp019	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	2	Kp017	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
3	Kp024	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
4	Kp025	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
5	Kp026	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
6	Kp027	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
	Kp029	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Kp030	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	7	Kp031	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
	Kp032	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Kp033	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	8	Kp034	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
9	Kp035	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
10	Kp037	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
11	kp039	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
12	Kp048	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
13	Kp050	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	
14	Kp052	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Kp053	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
15	Kp061	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Kp062	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
16	Kp065	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
17	Kp066	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Kp072	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
18	Kp096	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
19	Kp080	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
	Kp082	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

Número de Paciente	Código de las CRKP en el IBUN	Pruebas bioquímicas							
		TSI			Urea	Citrato	SIM		
		Fermentación de carbohidratos	Producción de Gas	Producción de H2S			H2S	Indol	Movilidad
20	Kp078	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
21	Kp089	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
22	Kp091	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
23	Kp101	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
24	Kp103	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
25	Kp104	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
26	Kp105	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
27	Kp108	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
28	Kp119	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
29	Kp120	A/A	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

En color azul se encuentran los pacientes COVID-19 y sus respectivos aislamientos CRKP. Resultado: (+): positivo; (-): negativo. Medios de cultivo: TSI: tres azúcares de hierro; SIM: sulfuro, indol, movilidad. H2S: ácido sulfúrico.

### 3. Características de los ensamblajes de los 39 genomas de los aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos

Número paciente	Código del IBUN	Tamaño del ensamblaje	Profundidad	% GC	N50	Número de Contigs
1	Kp021	5445162	64,69	57.41	193.163	93
2	Kp017	5451911	133,14	57.40	198.100	77
	Kp018	5357853	102,36	57.87	225.113	89
	Kp019	5446558	110,35	57.41	233.700	85
3	Kp024	5663944	128,68	57.23	448.457	58
4	Kp025	5564713	165,16	57.16	175.882	68
5	Kp026	5517442	123,92	57.34	49.842	207
6	Kp027	5587119	132,35	57.15	343.415	46
7	Kp029	5449973	92,91	57.41	225.324	78
	Kp030	5438528	96,37	57.23	313.979	50
	Kp031	5436191	85,88	57.24	278.175	56
8	Kp032	5652461	84,09	57.28	313.979	48
	Kp033	5449404	51,12	57.43	304.754	70
	Kp034	5450489	50,02	57.43	198.564	72
9	Kp035	5446453	60,96	57.42	217.910	67
10	Kp037	5520913	66,55	57.35	301.679	75
11	kp039	5514430	95,63	57.13	216.357	58
12	Kp048	5907364	80,94	56.95	214.633	110
13	Kp050	5472682	98,33	57.43	179.036	70
14	Kp052	5857075	92,97	57.01	134.163	114
	Kp053	5791237	90,1	57.07	137.127	105
15	Kp061	5463816	75,11	57.37	225.113	85
	Kp062	5453682	79,12	57.4	193.164	78
16	Kp065	5464749	119,89	57.39	328.120	68
17	Kp066	5415078	122,46	57.46	273.548	65
	Kp072	5417183	106,58	57.45	326.520	63
18	Kp096	5645552	79,35	57,02	233.445	63
19	Kp080	5456754	110,07	57,4	196.195	76

Número paciente	Código del IBUN	Tamaño del ensamblaje	Profundidad	% GC	N50	Número de Contigs
	Kp082	6020697	96,67	56.92	129.489	112
20	Kp078	5883756	121,93	56.88	199.156	84
21	Kp089	5464912	77,43	57.23	451.732	28
22	Kp091	5559694	147,79	57.18	619.412	41
23	KP101	5412221	93,08	57.26	277.831	43
24	Kp103	5510621	76,57	57.19	877.287	28
25	Kp104	5630978	73,84	57.07	272.724	44
26	Kp105	5420107	80,85	57.26	753.681	34
27	Kp108	5266299	94,62	57.61	219.991	43
28	Kp119	5886961	75,02	56.93	171.390	96
29	Kp120	5880849	70,05	56.92	164.031	103
Promedio		5555790	95,05	57,33	277.338	73
Mínimo		5266299	50,02	57,02	49.842	28
Máximo		6020697	165,16	57,46	877.287	207

En color azul se encuentran los pacientes COVID-19 y sus respectivos aislamientos CRKP

**4. Características de la anotación de los ensamblajes de los 39 genomas de los aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos.**

Número paciente	Código del IBUN	CDS	tRNA	rRNA	Genes predichos
1	Kp021	5067	77	7	5293
2	Kp017	5071	78	8	5300
	Kp018	4969	78	8	5196
	Kp019	5070	78	8	5298
3	Kp024	5261	76	9	5478
4	Kp025	5191	78	9	5415
5	Kp026	5151	80	8	5376
6	Kp027	5199	79	10	5421
7	Kp029	5068	76	7	5292
	Kp030	5061	78	8	5274
	Kp031	5270	78	8	5270
8	Kp032	5252	80	7	5470
	Kp033	5085	78	7	5307
	Kp034	5088	78	8	5313
9	Kp035	5084	77	8	5306
10	Kp037	5157	78	9	5385
11	kp039	5151	80	9	5374
12	Kp048	5589	78	9	5831
13	Kp050	5109	76	7	5332

En color azul se encuentran los pacientes COVID-19 y sus respectivos aislamientos CRKP

Número paciente	Código del IBUN	CDS	tRNA	rRNA	Genes predichos
14	Kp052	5526	78	11	5771
	Kp053	5449	78	11	5691
15	Kp061	5087	78	8	5316
	Kp062	5070	77	8	5297
16	Kp065	5094	76	8	5319
17	Kp066	5036	77	7	5254
	Kp072	5046	78	9	5266
18	Kp096	5298	76	8	5520
19	Kp080	5084	76	8	5310
	Kp082	5720	76	9	5964
20	Kp078	5567	77	11	5803
21	Kp089	5106	77	8	5327
22	Kp091	5239	80	7	5460
23	KP101	5035	76	8	5242
24	Kp103	5159	79	10	5386
25	Kp104	5219	81	10	5443
26	Kp105	5001	79	9	5223
27	Kp108	4898	77	7	5115
28	Kp119	5566	78	10	5804
29	Kp120	5557	76	10	5798
<b>Promedio</b>		5196	78	8	5416
<b>Mínimo</b>		4898	76	7	5115
<b>Máximo</b>		5720	81	11	5964

En color azul se encuentran los pacientes COVID-19 y sus respectivos aislamientos CRKP







**7. Genes de resistencia asociados a las *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos presentes en el clado IV del árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en los SNPs del core de las 39 CRKP del estudio**

Paciente	CRKP	Fecha de Aislamiento	CTX-M-15	ampH	OXA-1	SHV-1	SHV-28	TEM-1	KPC-3	LptD	OmpK37	PBP3	EF-Tu	emrR	QnrB1	adeF	rsmA	oqxA	marA	KpnH	KpnG	KpnF	KpnE	H-NS	CRP	APH(6)-Id	AAC(6)-Ib-cr	baeR	dfrA14	sul2	UhpT	FosA6	catI	tet(A)	tet(D)	eptB	ArnT	msbA
2	Kp018	12/04/20	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
15	Kp061	7/12/20	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
	Kp062	7/12/20	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
2	Kp019	16/04/20	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
1	Kp021	23/03/20	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
16	Kp065	27/02/21	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
19	Kp080	27/01/21	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
7	Kp029	26/07/20	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
2	Kp017	18/04/20	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1
27	Kp108	9/06/21	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1
10	Kp037	24/10/20	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
17	Kp066	17/02/21	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
	Kp072	20/02/21	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
9	Kp035	24/10/20	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
13	Kp050	30/11/20	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
8	Kp033	15/09/20	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
	Kp034	17/09/20	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1

En color azul se encuentran los pacientes COVID-19 y sus respectivos aislamientos CRKP. Genes: en azul los genes presentes en plásmidos; en naranja los genes presentes en el cromosoma. El (1) indica la presencia del gen, mientras que el (0) la ausencia del gen



## Bibliografía

- Adler, A., Hussein, O., Ben-david, D., Masarwa, S., Navon-venezia, S., Schwaber, M. J., Carmeli, Y., Setton, E., Golan, S., Brill, S., Lipkin, V., Frodin, E., Mendelson, G., Rave, R., Yehuda, N., Aizen, I., Kaganski, M., Gershkovich, P., Sasson, A., ... Charish, L. (2015). Persistence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 as the predominant clone of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in post-acute-care hospitals in Israel, 2008-13. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(1), 89–92. <https://doi.org/10.1093/jac/dku333>
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A. L. V., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H. K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., ... McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: Antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, *48*(D1), D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Amarsy, R., Jacquier, H., Munier, A. L., Merimèche, M., Berçot, B., & Mégarbane, B. (2021). Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit during the COVID-19 pandemic: Another nightmare. *American Journal of Infection Control*, *49*(10), 1324–1326. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2021.07.004>
- Andrews, S. (2013). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Arabaghian, H., Salloum, T., Alousi, S., Panossian, B., Araj, G. F., & Tokajian, S. (2019). Molecular Characterization of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella quasipneumoniae* Isolated from Lebanon. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-36554-2>
- Arcari, G., Raponi, G., Sacco, F., Bibbolino, G., Di Lella, F. M., Alessandri, F., Coletti, M., Trancassini, M., Deales, A., Pugliese, F., Antonelli, G., & Carattoli, A. (2021). *Klebsiella pneumoniae* infections in COVID-19 patients: a 2-month retrospective analysis in an Italian hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *57*(1), 106245. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106245>
- Arteaga-Livias, K., Pinzas-Acosta, K., Perez-Abad, L., Panduro-Correa, V., Rabaan, A. A., Pecho-Silva, S., & Dámaso-Mata, B. (2022). A multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a Peruvian hospital: Another threat from the COVID-19 pandemic. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, *43*(2), 267–268. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.1401>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V.,

- Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bioptric. (2020). Qsep100. <https://www.bioptric.com.tw/product/instruments/qsep100-series/qsep100>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Cantón, R., Gijón, D., & Ruiz-Garbajosa, P. (2020). Antimicrobial resistance in ICUs: An update in the light of the COVID-19 pandemic. *Current Opinion in Critical Care*, 26(5), 433–441. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000755>
- Cataño-Correa, J. C., Cardona-Arias, J. A., Mancilla, J. P. P., & García, M. T. (2021). Bacterial superinfection in adults with COVID-19 hospitalized in two clinics in Medellín-Colombia, 2020. *PLoS ONE*, 16(7 July), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254671>
- CDC. (2019). *Antibiotic Resistance Threats in the United States*. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>
- CLSI. (2020). M100-S30: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 30th ed. Informational Supplement*. <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>
- Curiao, T., Marchi, E., Viti, C., Oggioni, M. R., Baquero, F., Martinez, J. L., & Coque, T. M. (2015). Polymorphic variation in susceptibility and metabolism of triclosan-resistant mutants of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical strains obtained after exposure to biocides and antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3413–3423. <https://doi.org/10.1128/AAC.00187-15>
- De Angelis, G., Giacomo, P. Del, Posteraro, B., Sanguinetti, M., & Tumbarello, M. (2020). Molecular mechanisms, epidemiology, and clinical importance of  $\beta$ -lactam resistance in enterobacteriaceae. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 14, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21145090>
- Dhanao, A., Fang, N. C., Hassan, S. S., Kaniappan, P., & Rajasekaram, G. (2011). Epidemiology and clinical characteristics of hospitalized patients with pandemic influenza A (H1N1) 2009 infections: The effects of bacterial coinfection. *Virology Journal*, 8(1), 501. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-501>
- Dong, N., Zhang, R., Liu, L., Li, R., Lin, D., Chan, E. W. C., & Chen, S. (2018). Genome analysis of clinical multilocus sequence Type 11 *Klebsiella Pneumoniae* from China. *Microbial Genomics*, 4(2). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000149>
- Dortet, L., Girlich, D., Virlouvet, A. L., Poirel, L., Nordmann, P., Iorga, B. I., & Naas, T. (2017). Characterization of BRPMBL, the bleomycin resistance protein associated with the carbapenemase NDM. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3). <https://doi.org/10.1128/AAC.02413-16>
- ECDC. (2018). *Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana en Europa*. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf>
- Founou, R. C., Founou, L. L., Allam, M., Ismail, A., & Essack, S. Y. (2019). Whole Genome Sequencing of Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing

- Klebsiella pneumoniae Isolated from Hospitalized Patients in KwaZulu-Natal, South Africa. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42672-2>
- García-Betancur, J. C., Appel, T. M., Esparza, G., Gales, A. C., Levy-Hara, G., Cornistein, W., Vega, S., Nuñez, D., Cuellar, L., Bavestrello, L., Castañeda-Méndez, P. F., Villalobos-Vindas, J. M., & Villegas, M. V. (2021). Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 19(2), 197–213. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1813023>
- García-Meniño, I., Forcelledo, L., Rosete, Y., García-Prieto, E., Escudero, D., & Fernández, J. (2021). Spread of OXA-48-producing Klebsiella pneumoniae among COVID-19-infected patients: The storm after the storm. *Journal of Infection and Public Health*, 14(1), 50–52. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.11.001>
- Ghosh, S., Bornman, C., & Zafer, M. M. (2021). Antimicrobial Resistance Threats in the emerging COVID-19 pandemic: Where do we stand? *Journal of Infection and Public Health*, 14(5), 555–560. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.02.011>
- Gomez-Simmonds, A., Annavajhala, M. K., McConville, T. H., Dietz, D. E., Shoucri, S. M., Laracy, J. C., Rozenberg, F. D., Nelson, B., Greendyke, W. G., Furuya, E. Y., Whittier, S., & Uhlemann, A.-C. (2020). Carbapenemase-producing Enterobacteriales causing secondary infections during the COVID-19 crisis at a New York City hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, November 2020, 380–384. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa466>
- Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., Tan, Y. Y., Chen, S. D., Jin, H. J., Tan, K. Sen, Wang, D. Y., & Yan, Y. (2020). The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak- A n update on the status. *Military Medical Research*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00240-0>
- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T. R., Hsu, L. Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M. B., Edwards, D. J., Van Nguyen, K., Nguyen, T. V., Dao, T. T., ... Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(27), E3574–E3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>
- Hoque, M. N., Akter, S., Mishu, I. D., Islam, M. R., Rahman, M. S., Akhter, M., Islam, I., Hasan, M. M., Rahaman, M. M., Sultana, M., Islam, T., & Hossain, M. A. (2021). Microbial co-infections in COVID-19: Associated microbiota and underlying mechanisms of pathogenesis. *Microbial Pathogenesis*, 156(April), 104941. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104941>
- Howard-Jones, A. R., Sandaradura, I., Robinson, R., Orde, S. R., Iredell, J., Ginn, A., van Hal, S., & Branley, J. (2022). Multidrug-resistant OXA-48/CTX-M-15 Klebsiella pneumoniae cluster in a COVID-19 intensive care unit: salient lessons for infection prevention and control during the COVID-19 pandemic. *Journal of Hospital Infection*, 126, 64–69. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.05.001>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X.,

- Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Illumina. (2020). *Illumina DNA Prep Reference Guide*. [www.illumina.com/company/legal.html.%0Ahttps://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/illumina\\_prep/illumina-dna-prep-reference-guide-1000000025416-09.pdf](http://www.illumina.com/company/legal.html.%0Ahttps://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/illumina_prep/illumina-dna-prep-reference-guide-1000000025416-09.pdf)
- INS. (2019). *Informe de Resultados de la Vigilancia por Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana en Infecciones Asociadas a La Atención en Salud (IAAS) 2018*. [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin de laboratorio/Informe-vigilancia-por-laboratorio-resistencia-antimicrobiana-y-whonet-IAAS-2018.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Informe-vigilancia-por-laboratorio-resistencia-antimicrobiana-y-whonet-IAAS-2018.pdf)
- Instituto Nacional de Salud [INS]. (2022). *COVID-19 en Colombia*. <https://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/Coronavirus.aspx>
- Invitrogen. (2020). *PureLink® Genomic DNA Kits*. [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink\\_genomic\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_genomic_man.pdf)
- Kieffer, N., Aires-de-Sousa, M., Nordmann, P., & Poirel, L. (2017). High rate of MCR-1–producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among pigs, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), 2023–2029. <https://doi.org/10.3201/eid2312.170883>
- Krapp, F., Morris, A. R., Ozer, E. A., & Hauser, A. R. (2017). Virulence Characteristics of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains from Patients with Necrotizing Skin and Soft Tissue Infections. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13524-8>
- Lee, Y. J., Huang, C. H., IIsan, N. A., Lee, I. H., & Huang, T. W. (2021). Molecular epidemiology and characterization of carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* isolated from urine at a teaching hospital in Taiwan. *Microorganisms*, 9(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020271>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li, J., Zhang, H., Ning, J., Sajid, A., Cheng, G., Yuan, Z., & Hao, H. (2019). The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0489-3>
- Lomonaco, S., Crawford, M. A., Lascols, C., Timme, R. E., Anderson, K., Hodge, D. R., Fisher, D. J., Pillai, S. P., Morse, S. A., Khan, E., Hughes, M. A., Allard, M. W., & Sharma, S. K. (2018). Resistome of carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS ONE*, 13(6), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198526>
- Manohar, P., Loh, B., Nachimuthu, R., Hua, X., Welburn, S. C., & Leptihn, S. (2020). Secondary Bacterial Infections in Patients With Viral Pneumonia. *Frontiers in Medicine*, 7(August), 2013–2016. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00420>
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JAN), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- Mędrzycka-Dabrowska, W., Lange, S., Zorena, K., Dabrowski, S., Ozga, D., & Tomaszek, L. (2021). Carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* infections in icu covid-19



- patients—a scoping review. *Journal of Clinical Medicine*, 10(10), 1–13.  
<https://doi.org/10.3390/jcm10102067>
- Meir-Gruber, L., Manor, Y., Gefen-Halevi, S., Hindiyeh, M. Y., Mileguir, F., Azar, R., Smollan, G., Belausov, N., Rahav, G., Shamiss, A., Mendelson, E., & Keller, N. (2016). Population screening using sewage reveals pan-resistant bacteria in hospital and community samples. *PLoS ONE*, 11(10), 1–13.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164873>
- Mendes, G., Ramalho, J. F., Duarte, A., Pedrosa, A., Silva, A. C., Méndez, L., & Caneiras, C. (2022). First Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 in a Portuguese Hospital Centre during the COVID-19 Pandemic. *Microorganisms*, 10(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020251>
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- Nori, P., Cowman, K., Chen, V., Bartash, R., Szymczak, W., Madaline, T., Punjabi Katiyar, C., Jain, R., Aldrich, M., Weston, G., Gialanella, P., Corpuz, M., Gendlina, I., & Guo, Y. (2020). Bacterial and fungal co-infections in COVID-19 patients hospitalized during the New York city pandemic surge. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2020, 1–5. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.368>
- OECD. (2018). *Stemming the Superbug Tide: Just A Few Dollars More*. <https://www.oecd.org/els/health-systems/Stemming-the-Superbug-Tide-Policy-Brief-2018.pdf>
- OMS. (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1)
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2022). *Panel de la OMS sobre la enfermedad por coronavirus (COVID-19)*. <https://covid19.who.int/>
- Österblad, M., Kirveskari, J., Hakanen, A. J., Tissari, P., Vaara, M., & Jalava, J. (2012). Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Finland: The first years (2008–11). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(12), 2860–2864.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dks299>
- Pintado, V., Ruiz-Garbajosa, P., Escudero-Sanchez, R., Gioia, F., Herrera, S., Vizcarra, P., Fortún, J., Cobo, J., Martín-Dávila, P., Morosini, M. I., Cantón, R., & Moreno, S. (2022). Carbapenemase-producing Enterobacterales infections in COVID-19 patients. *Infectious Diseases*, 54(1), 36–45.  
<https://doi.org/10.1080/23744235.2021.1963471>
- Pitout, J. D. D., Nordmann, P., & Poirel, L. (2015). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 59, Issue 10, pp. 5873–5884). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AAC.01019-15>
- Prezioso, S. M., Brown, N. E., & Goldberg, J. B. (2017). Eifamycins: inhibitors of elongation factor-Tu. *Molecular Microbiology*, 106(1), 22–34.  
<https://doi.org/10.1111/mmi.13750>
- PubMLST. (2022). *Bases de datos públicas para tipificación molecular y diversidad del genoma microbiano*. <https://pubmlst.org/>
- Pulzova, L., Navratilova, L., & Comor, L. (2017). Alterations in Outer Membrane Permeability Favor Drug-Resistant Phenotype of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance*, 23(4), 413–420. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0017>

- Remolina Granados, S. A., & Escobar Castaño, C. J. (2017). *Descripción de Tipos de Carbapenemasas Expresadas en Klebsiella sp. y Pseudomonas aeruginosa en Hospitales de Tercer Nivel de la Ciudad de Bogotá, Estudio Descriptivo. Parte 1* [Tesis de Especialización, Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/62824/SergioA.RemolinaGranados.2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rojas, L. J., Weinstock, G. M., De La Cadena, E., Diaz, L., Rios, R., Hanson, B. M., Brown, J. S., Vats, P., Phillips, D. S., Nguyen, H., Hujer, K. M., Correa, A., Adams, M. D., Perez, F., Sodergren, E., Narechania, A., Planet, P. J., Villegas, M. V., Bonomo, R. T. A., & Arias, C. A. (2018). An analysis of the epidemic of klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing k. pneumoniae: Convergence of two evolutionary mechanisms creates the “perfect storm.” *Journal of Infectious Diseases*, 217(1), 82–92. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix524>
- Saavedra, S. Y., Bernal, J. F., Montilla-Escudero, E., Arévalo, S. A., Prada, D. A., Valencia, M. F., Moreno, J., Hidalgo, A. M., Garcíá-Vega, Á. S., Abrudan, M., Argimón, S., Kekre, M., Underwood, A., Aanensen, D. M., Duarte, C., Donado-Godoy, P., Abudahab, K., Harste, H., Muddyman, D., ... Vegvari, C. (2021). Complexity of Genomic Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Colombia Urges the Reinforcement of Whole Genome Sequencing-Based Surveillance Programs. *Clinical Infectious Diseases*, 73(Suppl 4), S290–S299. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab777>
- Saini, V., Jain, C., Singh, N. P., Alsulimani, A., Gupta, C., Dar, S. A., Haque, S., & Das, S. (2021). Paradigm shift in antimicrobial resistance pattern of bacterial isolates during the covid-19 pandemic. *Antibiotics*, 10(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080954>
- Samanta, I., & Bandyopadhyay, S. (2020). *Klebsiella*. *Antimicrobial Resistance in Agriculture*, 258, 153–169. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815770-1.00014-6>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Sepandi, M., Taghdir, M., Alimohamadi, Y., Afrashteh, S., & Hosamirudsari, H. (2020). Factors associated with mortality in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. *Iranian Journal of Public Health*, 49(7), 1211–1221. <https://doi.org/10.18502/ijph.v49i7.3574>
- Shelburne, S. A., Kim, J., Munita, J. M., Sahasrabhojane, P., Shields, R. K., Press, E. G., Li, X., Arias, C. A., Cantarel, B., Jiang, Y., Kim, M. S., Aitken, S. L., & Greenberg, D. E. (2017). Whole-genome sequencing accurately identifies resistance to extended-spectrum  $\beta$ -lactams for major gram-negative bacterial pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, 65(5), 738–745. <https://doi.org/10.1093/cid/cix417>
- Shelenkov, A., Petrova, L., Mironova, A., Zamyatin, M., Akimkin, V., & Mikhaylova, Y. (2022). Long-Read Whole Genome Sequencing Elucidates the Mechanisms of Amikacin Resistance in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Obtained from COVID-19 Patients. *Antibiotics*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101364>
- Shon, A. S., Bajwa, R. P. S., & Russo, T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella Pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence*, 4(2), 107–118. <https://doi.org/10.4161/viru.22718>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313.

- <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Talero Osorio, D. C. (2022). *Identificación de contigs asociados a plásmidos obtenidos a partir de secuenciación de genoma completo de aislamientos de Klebsiella pneumoniae. Universidad Nacional de Colombia*. [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/81811>
- T.Seemann. (2022a). *mlst Github*. <https://github.com/tseemann/mlst>
- T.Seemann. (2022b). *snippy*. <https://github.com/tseemann/snippy>
- Thermo Scientific™ Oxoid™. (2020). *Medios deshidratados*. <http://www.analisisavanzados.com/index.php/catalogo-general-de-productos-oxid?article=&id=119>
- Tiri, B., Sensi, E., Marsiliani, V., Cantarini, M., Priante, G., Vernelli, C., Martella, L. A., Costantini, M., Mariottini, A., Andreani, P., Bruzzzone, P., Suadoni, F., Francucci, M., Cirocchi, R., & Cappanera, S. (2020). Antimicrobial Stewardship Program, COVID-19, and Infection Control: Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Colonization in ICU COVID-19 Patients. What Did Not Work? *Journal of Clinical Medicine*, 9(9), 2744. <https://doi.org/10.3390/jcm9092744>
- Wilson, H., & Török, M. E. (2018). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microbial Genomics*, 4(7). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000197>
- World Health Organization. (2020). *Coronavirus disease 2019 (COVID-19): situation report, 51*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331475>
- Wu, H., Li, D., Zhou, H., Sun, Y., Guo, ling, & Shen, D. (2017). Bacteremia and other body site infection caused by hypervirulent and classic *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 104, 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.049>
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>
- Zhu, X., Ge, Y., Wu, T., Zhao, K., Chen, Y., Wu, B., Zhu, F., Zhu, B., & Cui, L. (2020). Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases Xiaojuan. *Virus Research*, 285. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198005>