



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE
AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* MEDIANTE
SECUENCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO (WGS)**

Angela Patricia Coral Gamboa

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia
2023

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO (WGS)

Angela Patricia Coral Gamboa

Tesis presentada como requisito para optar al título de:
Magister en Ciencias Microbiología

Director (a):

Ph.D. Emiliano Barreto Hernández

Codirector (a):

MSc. Ma.Teresa Jesús Reguero Reza

Línea de Investigación:

Biología molecular de agentes infecciosos

Grupo de Investigación:

Epidemiología Molecular

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Instituto de Biotecnología

Bogotá, Colombia

2023

Para la Luz de mi Alba.....

“He tratado de mantener una mente abierta; y no son las cosas ordinarias de la vida las que pueden cerrarla, sino las cosas extrañas; las cosas extraordinarias, las cosas que lo hacen dudar a uno si son locura o realidad.”

Bram Stoker

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.



Ángela Patricia Coral Gamboa

30/01/2023

Agradecimientos

El ser humano es un ser que por naturaleza convive en sociedad colaborando a sus iguales para evolucionar y crecer, por esta razón quiero agradecer al profesor Emiliano Barreto y a la profesora María Teresa Reguero por haberme permitido la posibilidad de desarrollar mi trabajo de investigación con ellos, al profesor Daniel Uribe Vélez por su apoyo y acompañamiento, a Alexandra Hernández Páez quien fue mi perseverante compañera de laboratorio , a Nicole, Diego y Sebastián porque sin su ayuda no hubiese sido posible el desarrollo de mi proyecto, así como también a cada una de las personas que estuvieron presentes en algún momento del camino ; a Jeisson García y Yolanda Buitrago por su incansable trabajo por y para que cada estudiante pueda desarrollar su proyecto.

A las doctoras: Olga Lucia Tovar Aguirre mi querida docente de pregrado de la UCM y a la Doctora Aura Lucia Leal jurados de este trabajo de investigación.

De manera especial a Diana Carolina Barrera MSc. por su ayuda amorosa e incondicional , así como también al personal del Hospital universitario Nacional por su disposición especialmente a al Doctor Jorge Cortés, Diana M. Pintor, la Jefe Mónica Aguilera y personal del laboratorio.

A mi padre por su lucha incansable y apoyo; al igual que a mi familia, compañeros en este camino y amigos especialmente a Álvaro, Janneth F., José Luis, Angelica, Eunice, Luz Nelly, Fernando, Cristina, Juliana, Bladimir, Gabriel, A. Felipe, Valentina, Isabella, Dania, Suzanne, Gustavo Fuentes, Amparo Diaz, Ceci Cortés, Camilo Galindo, Sonia Gutiérrez, Miguel Hernández y María Riascos por creer siempre en mí.

Finalmente quiero darme las gracias por seguir adelante a pesar de los tiempos difíciles.

Resumen

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO (WGS)

El fenómeno de la resistencia bacteriana ha cobrado fuerza en los últimos años, se estima que para el año 2050 el número de muertes asociadas a esta llegue a más de 10 millones de individuos en el mundo. En Colombia uno de los microorganismos resistentes a nivel hospitalario más aislados en servicios de UCI y hospitalización es *Klebsiella pneumoniae* tipo *KPC*, un bacilo Gram negativo formador de cápsula, productor de carbapenemasas. El gen *bla_{KPC}* ubicado cerca del transposón Tn4401 en su genoma, confiere resistencia a los antibióticos carbapenémicos. El objetivo de este estudio fue evaluar el comportamiento epidemiológico y la variación de los perfiles genómicos de resistencia a antibióticos de cepas *KPC* de *K. pneumoniae*, provenientes de aislamientos clínicos, mediante Secuenciación de Genoma Completo (WGS). En total se procesaron 37 aislamientos recolectados entre 2019 y 2020, de los cuales el 51,35% presentaron un fenotipo multidrogo resistente (MDR). El mecanismo de resistencia bomba de eflujo de antibióticos fue el más frecuente en el resistoma (51,16%). En los 37 aislamientos se observó una baja diversidad clonal, detectándose cuatro *clado* que incluían el 83,78% de los aislamientos. El análisis por MLST mostró que el ST predominante fue ST1082 presente en el 48,6% de los aislamientos agrupados en el *clado* 4. Este grupo clonal fue el más circulante en el hospital y estuvo caracterizado por portar elementos móviles de resistencia como *bla_{KPC}*, *bla_{TEM-1}* y *tet*. No se evidenciaron brotes a causa de ST1082 ya que estuvo circulando en todos los servicios del hospital durante todo el tiempo de estudio, condiciones por las cuales podría considerarse de un caso endémico y no de un brote en el centro hospitalario. En conclusión el método WGS permitió identificar el resistoma de las cepas de *K. pneumoniae* y evaluar su epidemiología molecular mediante los diferentes mecanismos de resistencia que confieren los distintos genes, lo cual se convierte en una importante herramienta para la toma de decisiones en el uso de los antimicrobianos.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, *KPC*, Infecciones asociadas a la atención en salud, secuenciación de genoma completo, NGS.

Abstract

EVALUATION OF THE EPIDEMIOLOGICAL BEHAVIOR OF CLINICAL ISOLATES OF *Klebsiella pneumoniae* USING WHOLE GENOME SEQUENCING (WGS)

The phenomenon of bacterial resistance has gained strength in recent years, and it is estimated that by 2050 the number of deaths associated with it will reach more than 10 million individuals in the world. In Colombia, one of the most isolated resistant microorganisms at hospital level in ICU and hospitalization services is *Klebsiella pneumoniae* type KPC, a Gram-negative, capsule-forming, carbapenemase-producing bacillus. The blaKPC gene located near the Tn4401 transposon in its genome confers resistance to carbapenem antibiotics. The aim of this study was to evaluate the epidemiological behavior and variation of antibiotic resistance genomic profiles of KPC strains of *K. pneumoniae* from clinical isolates by Whole Genome Sequencing (WGS). A total of 37 isolates collected between 2019 and 2020 were processed, of which 51.35% showed a multidrug resistant (MDR) phenotype. The antibiotic efflux pump resistance mechanism was the most frequent in the resistome (51.16%). Low clonal diversity was observed in the 37 isolates, with four clades including 83.78% of the isolates. The MLST analysis showed that the predominant ST was ST1082 present in 48.6% of the isolates grouped in clade 4. This clonal group was the most circulating in the hospital and was characterized by carrying mobile resistance elements such as blaKPC, blaTEM-1 and tet. There was no evidence of outbreaks due to ST1082 since it was circulating in all the hospital services during the entire study period, which could be considered an endemic case and not an outbreak in the hospital center. In conclusion, the WGS method made it possible to identify the resistome of *K. pneumoniae* strains and to evaluate their molecular epidemiology by means of the different resistance mechanisms conferred by the different genes, which becomes an important tool for decision-making in the use of antimicrobials.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, KPC, Healthcare Associated Infections, Whole Genome Sequencing

Contenido

	<u>Pág.</u>
Resumen.....	V
Abstract	VI
Lista de tablas	IX
Lista de figuras	¡Error! Marcador no definido.
Lista de anexos	¡Error! Marcador no definido.I
Lista de abreviaturas	¡Error! Marcador no definido.II
1. Introducción	1
2. Marco teórico	4
2.1 Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS).....	4
2.2 Vigilancia Epidemiológica	7
2.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de carbapenemasas o <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC 9	9
2.4 Secuenciación de genoma completo como herramienta diagnóstica	11
3. Estado del arte	13
4. Justificación.....	16
5. Pregunta de investigación.....	17
6. Objetivos	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos específicos.....	18
7. Metodología.....	19
7.1 Selección de pacientes, origen de los aislamientos bacterianos y firma de consentimientos informados en el Hospital Universitario Nacional	20
7.2 Identificación, aislamiento y recolección de muestras en el Hospital Universitario Nacional	20
7.3 Embalaje y Transporte.....	21
7.4 Recuperación y aislamiento del microorganismo	22

7.4.2 Aislamiento	22
7.5 Pruebas Bioquímicas	23
7.6 Ingreso a base de datos	24
7.7 Conservación de los aislamientos e ingreso al cepario.	25
7.8 Extracción de ADN genómico.....	25
7.9 Preparación de librerías para secuenciación	26
7.10 Secuenciación.....	26
7.11 Análisis bioinformático.....	27
8. Resultados y Discusión	29
8.1 Identificación del microorganismo y características epidemiológicas.....	29
7.1.1 Evaluación de sensibilidad a antibióticos.....	32
8.2 Obtención de ADNg, generación de librerías y secuenciación.....	36
8.3 Identificación de elementos genómicos asociados a resistencia	41
8.4 Tipificación por MLST.....	54
9. Conclusiones.....	62
10. Recomendaciones.....	63
11. Anexos	65
Anexo 1. Formato de consentimiento informado para los pacientes ¡Error! Marcador no definido.	
Anexo 2. Formato de seguimiento epidemiológico	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 3. Características epidemiológicasde los aislamientos de <i>K.pneumoniae</i> en estudio.....	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 4. Resultados de caracterización bioquímica para <i>K.pneumoniae</i> en estudio	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 5. Resistoma completo obtenido para los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> mediante RGI a partir de los datos de anotación	¡Error! Marcador no definido.
Anexo 6.Matriz de identidad de nucleótidos promedio ANI para los aislamientos de <i>K.pneumoniae</i> secuenciados	¡Error! Marcador no definido.
11.1.1 Anexo Divulgación	75
Anexo 11.11.1 Certificado de participación en el Segundo Simposio virtual de estudiantes y egresados en Biotecnología y Áreas afines, en el año 2020 como ponente en modalidad oral.	75
Anexo 11.11.2 Certificado de participación en el tercer Simposio virtual de estudiantes y egresados en Biotecnología y Áreas afines, en el año 2022 como ponente en modalidad poster.	76
12. Bibliografía	77

Lista de tablas

Tabla 1. <i>Secuencias de los index utilizados para la generación de librerías.....</i>	26
Tabla 2. <i>Antibiograma de cada uno de los aislamientos de Klebsiella pneumoniae realizado con el equipo BD Phoenix</i>	33
Tabla 3. <i>Cantidad y calidad de ADNg y librerías para secuenciación</i>	37
Tabla 4. <i>Características de los genomas ensamblados</i>	40
Tabla 5. <i>Resistoma obtenido mediante el software Prokka para los aislamientos de K. pneumoniae analizados.....</i>	41

Lista de figuras

Figura 1. Flujo de trabajo en el laboratorio.....	19
Figura 2. Medios de transporte de muestras provenientes del Hospital Universitario Nacional	21
Figura 3. Baterías bioquímicas para enterobacterias.....	23
Figura 4. Secuenciador Illumina Miseq perteneciente al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá.....	27
Figura 5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> en agar MacConkey.....	29
Figura 6. Baterías bioquímicas para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
Figura 7. Porcentaje de resistencia y sensibilidad a los antibióticos reportados en el antibiograma obtenido para el total de los aislamientos de estudio	35
Figura 8. Electroforesis de ADN genómico en gel de agarosa al 1%	38
Figura 9. Genes cromosómicos relacionados con resistencia a antibióticos de los aislamientos de <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> obtenidos mediante RGI a partir de los datos de anotación.....	50
Figura 10. Genes plasmídicos relacionados con resistencia a antibióticos de los aislamientos de <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> obtenidos mediante RGI a partir de los datos de anotación.....	51
Figura 11. Identidad de nucleótidos promedio (ANI) para los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> analizados....	57
Figura 12. Línea de tiempo de aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> en el HUN, ST identificados y origen de las muestras	61

Lista de anexos

Anexo 1. Formato de consentimiento informado para los pacientes.....	65
Anexo 2. Formato de seguimiento epidemiológico	67
Anexo 3. Características epidemiológicas de los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> en estudio	71
Anexo 4. Resultados caracterización bioquímica para <i>K. pneumoniae</i>	72
Anexo 5. Resistoma completo obtenido para los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> mediante RGI a partir de los datos de anotación	73
Anexo 6. Matriz de identidad de nucleótidos promedio ANI para los aislamientos de <i>K. pneumoniae</i> secuenciados.....	74

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ANI	Identidad de nucleótidos promedio (del inglés Average nucleotide identity)
AMC	Amoxicilina clavulanato
AMS	Ampicilina sulbactam
AMK	Amikacina
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CAZ/AVI	Ceftazidima Avibactam
CIP	Ciprofloxacina
CFZ	Cefazolina
C/T	Ceftolozano Tazobactam
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (del inglés Clinical and Laboratory Standard Institute)
CRO	Ceftriazona
CXM	Cefuroxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés deoxyribonucleic acid)
DNAg	Ácido desoxirribonucleico genómico (del inglés genomic deoxyribonucleic acid)
EI	Extra institucional
ETP	Ertapenem
FEP	Cefepima
FOX	Cefoxitina

Contenido

GEN	GENTAMICINA
HOSPI	Hospitalización
HUN	Hospital universitario Nacional
I	Intermedio
IAAS	Infecciones Asociadas a Atención en Salud
II	Intra institucional
IMI	Imipenem
KPC	<i>klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MER	Meropenem
MLST	Multi-locus Secuencio-tipo
MR	Multiresistente
MDR	Multidrogoresistente
NIT	Nitrofurantoina
NOR	Norfloxacin
NCBI	Centro Nacional para Información de Biotecnología (del inglés National Center for Biotechnology Information)
NR	No resistente
OMS	Organización mundial de la salud
OPS/PAHO	Organización panamericana de la salud
Pb	Pares de bases
PTZ	Piperacilina tazobactam
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido (del inglés single nucleotide polymorphism)
R	Resistente
S	Sensible
SIM	Sulfuro Indol Movilidad
ST	Secuencio-tipo
TGC	Tigeciclina

Contenido

TET	TETRACICLINA
TSI	Triple Azúcar Hierro (del inglés Triple Sugar Iron)
TMS	Trimetropin sulfamotaxazol
UCI	Unidad de cuidados intensivos
UCIN	Unidad de cuidados intermedios
WGS	Secuenciación de genoma completo (del inglés Whole Genome Sequencing)
X	No reportado

1. Introducción

La resistencia a los antibióticos considerados como de primer orden en el tratamiento de Infecciones Asociadas a Atención en Salud o IAAS se ha convertido en uno de los mayores desafíos de salud pública a nivel mundial (Willyard, 2017), lo que ha incentivado la investigación médica para encontrar nuevas estrategias que permitan la reducción gradual de dicho fenómeno, por ejemplo, al tener en cuenta las limitaciones en la efectividad de antibióticos de primer orden como los carbapenémicos y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación se ha promovido el desarrollo de nuevos inhibidores de enzimas que incrementen su efectividad. En Colombia, al igual que en muchos otros países, esta problemática se ha convertido en una preocupación creciente debido al incremento sostenido de la resistencia antimicrobiana en diversos patógenos. A medida que los microorganismos se vuelven más resistentes a los antimicrobianos de primer orden, es clara la necesidad de innovar en el estudio del resistoma bacteriano que a futuro permita establecer nuevos tratamientos acordes con los blancos terapéuticos disponibles para dichos microorganismos, además de realizar un control de infecciones efectivo que reduzca o elimine en gran medida la rotación de los mismos a nivel hospitalario.

Se estima que las bacterias capaces de producir resistencia a los antimicrobianos en Colombia están presentes en diferentes entornos de atención de la salud, incluidos hospitales, centros de atención primaria y comunidades. Según indica la organización mundial de la salud (OMS) ciertos patógenos han demostrado una capacidad excepcional para adquirir y transferir genes de resistencia especialmente mediante el uso de elementos genómicos móviles denominados plásmidos, por lo cual para el año 2017 la OMS planteo una estrategia vigente de control mediante la clasificación de dichos microorganismos según su grado de peligrosidad: Alta, Media y Critica donde se hace evidente la necesidad de conocer y controlar cepas multirresistentes, especialmente en bacterias Gramnegativas como *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas, *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y *Acinetobacter baumannii* resistente a cefalosporinas de tercera generación, estas bacterias hacen parte del grupo de peligrosidad critica debido su facilidad para adquirir y transferir mecanismos de resistencia mediante plásmidos. La resistencia a los antibióticos no solo afecta la eficacia de los tratamientos, sino que también prolonga la duración de las hospitalizaciones, aumenta los costos de atención médica y conlleva a un mayor riesgo de posibles complicaciones y mortalidad en los pacientes (OMS, 2017; Alvarez *et al.*, 2006; Pujol & Limon, 2013)

Entre las posibles causas del incremento de la resistencia antimicrobiana en Colombia se pueden mencionar: el uso inadecuado e indiscriminado de antibióticos tanto en humanos como en animales, además de la automedicación y la falta de cumplimiento del tratamiento prescrito, lo que podría favorecer la aparición del fenómeno como el denominado presión selectiva el cual implica la expresión fenotípica de elementos de resistencia que pudieran encontrarse dentro del genoma bacteriano en presencia de un determinado antibiótico y la adquisición de genes de resistencia asociados a plásmidos. Además, en algunos entornos de atención en salud se destaca, el acceso limitado a pruebas de diagnóstico microbiológico rápidas como el uso de sistemas automatizados de identificación y en algunos casos, por ejemplo en zonas alejadas del casco urbano, la posible falta de infraestructura y recursos adecuados para implementar medidas de control de infecciones eficientes y por último, el traslado de pacientes hacia centros hospitalarios de mayor nivel según sus requerimientos, que favorecen la propagación de cepas resistentes y elementos genómicos de resistencia (OMS, 2017; Cantón, 2023; Pasternan, 2023).

Se podría decir entonces que la resistencia a los antibióticos es un fenómeno complejo y multifactorial que involucra no solo a los sistemas de salud, sino también a la sociedad en su conjunto. Es necesario implementar estrategias integrales que promuevan el uso responsable de antibióticos, fomenten la investigación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos y fortalezcan la vigilancia epidemiológica de la resistencia a los antimicrobianos. La colaboración entre diferentes actores, incluidos profesionales de la salud, instituciones gubernamentales, la industria farmacéutica y la comunidad en general, es fundamental para enfrentar este desafío y preservar la eficacia de estos fármacos utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas en Colombia y en todo el mundo.

Este trabajo pretende evaluar el comportamiento epidemiológico de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas que fueron descritas como posibles agentes causales de Infecciones asociadas a atención en salud, provenientes del Hospital Universitario Nacional de Colombia, mediante el uso de secuenciación de genoma completo WGS (por sus siglas en inglés Whole Genome Sequencing) con el fin de obtener información genómica de las cepas y establecer la relación con los datos clínicos de cada paciente, además de identificar los elementos genómicos y mecanismos de resistencia a antimicrobianos presentes, lo que contribuirá a ampliar el conocimiento sobre este microorganismo, su diseminación en el centro hospitalario y sus posibles patrones de resistencia que permitan tener un mejor control de infecciones, además de la implementación y mejoramiento de protocolos a nivel intra hospitalario con el fin de realizar planes de contención para dicho microorganismo y finalmente proveer herramientas genómicas que promuevan el uso adecuado de los antimicrobianos en el centro hospitalario.

2. Marco teórico

2.1 Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS)

Las infecciones asociadas a la atención en salud también conocidas con IAAS, son aquellas infecciones que se adquieren durante el proceso de atención médica y que no estaban presentes ni en período de incubación al momento de ingresar a un centro de atención en salud. Estas infecciones representan un problema significativo en términos de morbilidad, mortalidad y costos adicionales para los pacientes en los sistemas de salud en todo el mundo. (Candace Friedman *et al.*, 2011). Según la Federación Internacional de Control de Infecciones (2014), el aislamiento del microorganismo causal puede ocurrir hasta pasadas las 48 horas a partir del ingreso del paciente a la institución hospitalaria.

Este tipo de infecciones se pueden clasificar en diferentes categorías teniendo en cuenta: el sitio de infección, el agente causante y el momento de su aparición. Según el manual de control de infecciones y epidemiología hospitalaria de la Organización Panamericana de la salud publicado en 2011 y actualizado en Enero de 2023 (Organización Panamericana de la salud, 2023) dos de las clasificaciones más comunes son: La clasificación según el momento y lugar donde se adquirió dicha infección clasificándolas como infecciones Intra o extra hospitalarias esta clasificación se establece dependiendo si el microorganismo causal y el desarrollo de la infección se dieron dentro de la institución donde fue aislado; y la clasificación según la fuente de infección la cual se divide en :

- **Infecciones del sitio quirúrgico (ISQ):** Estas infecciones se desarrollan en el sitio de una intervención quirúrgica y pueden afectar los tejidos superficiales o profundos. Se dividen en infecciones incisionales superficiales, infecciones incisionales profundas e infecciones de órgano/espacio. Estas son consideradas unas de las IAAS más comunes y se asocian con factores como la duración de la cirugía, la contaminación de la herida y la presencia de comorbilidades en el paciente.
- **Infecciones del tracto urinario asociadas a catéter (ITUAC):** Estas infecciones se producen cuando un catéter urinario está presente en el paciente. Pueden ser

sintomáticas o asintomáticas. Estas infecciones son una de las IAAS más frecuentes y están asociadas con la duración de la cateterización, la técnica aséptica durante la inserción del catéter, el mantenimiento del mismo, y la presencia de comorbilidades en el paciente.

- **Infecciones del torrente sanguíneo asociadas a un catéter (ITSAC):** Estas infecciones ocurren cuando se inserta y se mantiene un catéter intravascular, como un catéter venoso central. Las ITSAC pueden ser de dos tipos: la infección del torrente sanguíneo relacionado con el catéter (ITSRAC), la cual se diagnostica cuando se aísla el mismo microorganismo del cultivo de catéter y del cultivo de sangre periférica o hemocultivo, y la bacteriemia primaria asociada al catéter (BPAC), cuando solo se aísla el microorganismo causal del cultivo del catéter. Las ITSAC se relacionan con la duración prolongada de la cateterización, la técnica aséptica durante la inserción y el mantenimiento del catéter, y la inmunidad innata del paciente.
- **Neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM):** Esta infección se produce en pacientes que reciben ventilación mecánica en unidades de cuidados intensivos. La NAVM es una de las IAAS más graves y está asociada con la duración de la ventilación mecánica, la presencia de factores de riesgo como enfermedad pulmonar crónica y el uso de técnicas invasivas como la aspiración endotraqueal.
- **Bacteriemia asociada al catéter venoso central (BACVC):** Esta infección se desarrolla cuando se inserta y se mantiene un catéter venoso central durante un tiempo prolongado. La BACVC puede verse complicada por la presencia de fiebre, escalofríos y signos de infecciones sistémicas. La duración de la cateterización, la limpieza y desinfección periódica del catéter y la técnica aséptica son factores importantes en el desarrollo de esta infección.

Además de estas categorías, existen otras IAAS menos comunes, pero igualmente importantes, como las infecciones del tracto respiratorio inferior, las infecciones gastrointestinales asociadas a la atención médica y las infecciones del torrente sanguíneo no asociadas a catéter.

La Organización panamericana de la salud (OPS) advierte que en el mundo aproximadamente del 3,5 al 12 % de los pacientes ingresados en instituciones hospitalarias en los países desarrollados adquieren al menos una IAAS en su periodo de hospitalización, mientras que en los países en vía de desarrollo estos pacientes oscilan entre el 5,7 y 19,1%, llegando en algunos casos a cifras hasta del 25% (Organización mundial de la salud., 2003; Pujol & limon; 2013)

Entre los múltiples factores asociados a la adquisición de una IAAS por parte de un paciente se encuentran la susceptibilidad inmunológica, factores ambientales, comorbilidades preexistentes (Cáncer, hipertensión, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, consumo de sustancias psicoactivas, alcoholismo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes, entre otras) y la presencia del microorganismo. De este último se sabe que el ser humano se encuentra colonizado normalmente por una multiplicidad de microorganismos benéficos a los que se les denomina microbiota normal, que en general forman una barrera protectora adicional. Haciendo parte de esta microbiota están los denominados microorganismos oportunistas como por ejemplo *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* y *Lactobacillus spp.* que pueden representar en un momento determinado una amenaza para la salud del paciente, ya que en muchos casos, durante un proceso de enfermedad el sistema inmune no se encuentra en óptimo funcionamiento, y por tanto su respuesta frente a una infección causada por estos microorganismos se verá disminuida (Leal *et al.* 2006; Álvarez *et al.*, 2006 ; Organización Mundial de la Salud, 2003)

La prevención y el control de IAAS son fundamentales para reducir su incidencia; Se requieren estrategias multidireccionales que incluyan la educación y capacitación del personal de salud, el cumplimiento de prácticas de higiene de manos y control de infecciones, la implementación de protocolos de inserción y mantenimiento de dispositivos invasivos, el uso adecuado de antimicrobianos al momento de tratar una infección, la capacitación de pacientes y familiares en prácticas seguras para el mantenimiento de dispositivos, y protocolos de bioseguridad consecuentes con el aislamiento del paciente durante el periodo de hospitalización.

La prevención de la resistencia a antimicrobianos en IAAS, el control de infecciones y la implementación efectiva de protocolos de limpieza y desinfección, así como del uso efectivo de medicamentos a nivel intrahospitalario y la articulación de herramientas como la evaluación de los elementos genómicos de resistencia asociados a las cepas circulantes, otorga la posibilidad de realizar terapias antibióticas personalizadas para una resolución de la infección exitosa que promueva el incremento en la calidad de vida del paciente disminuyendo su estancia hospitalaria.

En resumen, las IAAS abarcan diversas categorías y representan un desafío importante en la seguridad y calidad de la atención médica. La precisa identificación y la clasificación de estas infecciones son fundamentales para implementar estrategias de prevención y control efectivos, y así reducir su impacto en los pacientes y los sistemas de salud.

2.2 Vigilancia Epidemiológica

La vigilancia epidemiológica en IAAS es un componente esencial de los programas de control de infecciones en salud pública. Se trata de un sistema estructurado en el cual se integran la recolección, análisis y monitoreo continuo de datos relacionados con las infecciones que se puedan adquirir durante la prestación de servicios de atención médica. El objetivo principal de la vigilancia epidemiológica en IAAS es identificar, prevenir y controlar la aparición y propagación de estas infecciones dentro de los entornos de atención de salud (López Vargas & Echeverri Toro, 2010). Es importante recalcar que este es un proceso continuo que requiere de la colaboración entre diferentes actores involucrados en la atención de salud. La notificación oportuna, la calidad de los datos y la comunicación efectiva son los pilares fundamentales para el éxito de este proceso. Además, la participación activa de los profesionales de la salud y la concientización sobre la importancia de la vigilancia epidemiológica en IAAS son clave para garantizar una atención médica segura y de calidad.

Esta estrategia se basa en la detección temprana de casos y en el reporte oportuno por parte de los profesionales de la salud, los laboratorios clínicos y otros actores involucrados en el cuidado de los pacientes los cuales juegan un papel clave en la identificación y reporte

de casos de IAAS. Los datos recopilados incluyen información sobre el tipo de infección, el microorganismo involucrado, el sitio de infección, el momento de aparición y el perfil fenotípico de resistencia y sensibilidad a los antimicrobianos del agente causal, entre otros. En muchos países del mundo se han establecido herramientas que permitan realizar este análisis y seguimiento, en Colombia el Sistema Nacional de Vigilancia en Resistencia a los Antimicrobianos (SINAVIR) es una iniciativa crucial que busca abordar la creciente amenaza de la resistencia antimicrobiana en el país (Instituto Nacional de Salud, 2019). Este sistema es liderado por el Instituto Nacional de Salud (INS) y desde sus inicios en el año 1987 tiene como objetivo recopilar, analizar y monitorear datos relacionados con la resistencia a los antimicrobianos en diferentes patógenos y entornos de atención en salud.

SINAVIR se basa en una red de laboratorios clínicos, hospitales y otros establecimientos de salud que notifican periódicamente datos sobre la sensibilidad de los microorganismos a los antibióticos. La información recopilada incluye datos de aislamientos bacterianos y fúngicos, así como los perfiles de resistencia antimicrobiana detectados. Esta información es analizada y reportada de manera periódica, lo que permite identificar patrones de resistencia, tendencias y brotes a nivel nacional; por otra parte, el Ministerio de Salud y Protección social de Colombia (MSPS) a través del Instituto Nacional de Salud (INS) inició para el año 2018 la implementación de un sistema de vigilancia de IAAS, dentro del que se han incluido los datos obtenidos por las entidades territoriales de salud en el país a través del sistema SIVIGILA que incluye los datos reportados por diferentes instituciones del sistema de salud que utilizan el software WHONET versión 5.6 de la OMS (Grupo de Microbiología, S. D. Instituto Nacional de Salud., 2018)(Grupo de Microbiología, S. D. Instituto Nacional de Salud., 2018)(Grupo de Microbiología, S. D. Instituto Nacional de Salud., 2018)(Grupo de Microbiología, S. D. Instituto Nacional de Salud., 2018)

Por otra parte, los datos de resistencia en Colombia también son recopilados por organizaciones como el Grupo para el control de la Resistencia Bacteriana en Bogotá – GREBO, que para el año 2018 reportó que *Klebsiella pneumoniae* fue el segundo microorganismo asociado a IAAS con mayor número de aislamientos en los servicios de UCI en pacientes adultos en la ciudad de Bogotá (Grupo de Microbiología, S. D. Instituto Nacional de Salud., 2018)

(López Vargas & Echeverri Toro, 2010)

En conclusión, la vigilancia epidemiológica en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud es un componente esencial de los programas de control de infecciones. Su objetivo es detectar y prevenir la aparición y propagación de estas infecciones dentro de los entornos de atención en salud. La recopilación, análisis e interpretación de datos permiten identificar tendencias y guiar las intervenciones para mejorar la seguridad del paciente y reducir la carga de las IAAS en la salud pública. (Grupo de Microbiología, S. D. Instituto Nacional de Salud., 2018)

2.3 *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas o *Klebsiella pneumoniae* KPC

Klebsiella pneumoniae es un bacilo Gram negativo de la familia de las enterobacterias, no móvil, fermentador de lactosa, formador de capsula, que media su proceso infeccioso mediante pilis y que es capaz de excretar lipopolisacárido como factor de virulencia mismo que interviene como mediador en procesos de colonización. Este microorganismo es ubicuo en la naturaleza lo que quiere decir que se puede encontrar en todas partes, *Klebsiella pneumoniae* ha sido aislada en agua, suelos, heces y ambientes hospitalarios, hace parte de la microbiota normal del intestino y mucosas de animales y mamíferos incluyendo al hombre. Según el grupo GREBO para el año 2018 fue uno de los patógenos más reportados en unidades de cuidados intensivos de adultos en centros hospitalarios de la ciudad de Bogotá D.C.

En cuanto a las *Klebsiella pneumoniae* KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa), estas cepas se caracterizan por producir enzimas hidrolíticas de la familia de las betalactamasas denominadas carbapenemasas que se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos además de Inhibir la acción del ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam, y funcionan impidiendo que el antibiótico pueda unirse a su sitio de

acción e inhibir la síntesis de la pared bacteriana, los genes más comúnmente asociados a la codificación de este tipo de enzimas son los pertenecientes a la familia KPC.

El primer aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en el mundo se reportó en un hospital en Carolina del Norte, Estados Unidos, en el año 1996 y según Nordmann (2014) su diseminación a nivel mundial ha sido progresiva gracias a la facilidad de estos genes de transferirse por medio de plásmidos intra y también interespecies bacterianas, lo cual se ha convertido en un problema de salud pública que ha dado pie para que surjan nuevas estrategias de identificación y control por medio de nuevas tecnologías como la secuenciación de genoma completo.

En Colombia el primer caso reportado de *Klebsiella pneumoniae* KPC, específicamente KPC-2, se realizó en el año 2005 en la ciudad de Medellín (Montufar-Andrade *et al.*,2016), mientras que en el año 2008 se reportaría el primer caso de cepas portadoras de genes tipo KPC-3 en la misma ciudad (Montufar-Andrade *et al.*,2016; Rojas *et al.*,2018). Según el Instituto Nacional de Salud de Colombia (INS) mediante el Sistema Nacional de Vigilancia de Resistencia antimicrobiana en IAAS para el año 2018 la diseminación de cepas de *klebsiella pneumoniae* portadoras de alguno de estos dos genes se había extendido por todo el territorio nacional, con lo que concuerdan algunos autores (Pacheco *et al.* 2014, Vera Leiva *et al.* 2017, Rojas *et al.* 2018) y además añaden que cepas de *klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos portadoras de genes tipo KPC-2 y KPC-3 son endémicas en Colombia desde el año 2010 o antes, y además indican que este tipo de problemáticas impulsan a los investigadores de este país para desarrollar nuevas estrategias de control epidemiológico e implementar nuevas tecnologías como la secuenciación de genoma completo a nivel de cada departamento dentro del territorio nacional.

2.4 Secuenciación de genoma completo como herramienta diagnóstica

La secuenciación de genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) ha emergido como una poderosa herramienta diagnóstica en el campo de las IAAS. Esta tecnología revolucionaria permite el análisis detallado de todo el material genético presente en una muestra clínica, lo que incluye no solo a microorganismos como *Klebsiella pneumoniae* KPC, sino también otros microorganismos presentes en el entorno clínico. La información proporcionada gracias a esta herramienta otorga una visión completa y precisa de la composición genética de los patógenos, permitiendo una identificación rápida y certera de la especie bacteriana, así como la detección de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana. (Echeverri Toro & Cataño Correa, 2010; Saavedra et al., n.d.)

La utilización de la secuenciación de genoma completo como herramienta diagnóstica en IAAS ha demostrado ser especialmente útil en la rápida identificación de brotes, diseminación, epidemiología y la detección de transmisión de elementos genómicos de resistencia a antibióticos en microorganismos patógenos especialmente en entornos de atención en salud. Al comparar las secuencias genómicas obtenidas de las diferentes bacterias aisladas de diferentes pacientes y ambientes, es posible identificar similitudes que sugieren la propagación de uno o varios clones bacterianos, lo cual facilita la implementación inmediata de medidas de prevención de la infección y control de la enfermedad, para contener un posible brote bacteriano o frenar la propagación de microorganismos residentes en centros hospitalarios y así evitar su diseminación intra y extra hospitalaria(Quainoo *et al.*, 2017).

Asimismo, el WGS permite una identificación más precisa de los mecanismos de resistencia antimicrobiana presentes en las bacterias causantes de IAAS. La detección de genes de resistencia a través de la secuenciación genómica ayuda a orientar el tratamiento antibiótico de manera más efectiva, evitando el uso de antibióticos inadecuados y permitiendo la elección de una terapia personalizada para cada paciente dirigida

específicamente al microorganismo en cuestión. Esto es especialmente relevante en el contexto del creciente reporte de cepas multidrogoresistentes a nivel mundial, que limita las opciones de tratamiento y representa un desafío en el manejo de infecciones asociadas a la atención en salud (Peterson, n.d.; Köser *et al.*, 2012; Marquez-Ortiz *et al.*, n.d).

Además, el WGS ofrece información valiosa sobre la evolución y la dinámica de las IAAS, lo que es fundamental para comprender mejor la epidemiología y los factores de riesgo asociados con estas infecciones. La secuenciación de genoma completo permite rastrear el origen de las infecciones, investigar posibles fuentes de contaminación y evaluar la eficacia de las intervenciones de control implementadas. No obstante, es importante destacar que la implementación de la secuenciación de genoma completo como herramienta diagnóstica en IAAS también conlleva desafíos. La interpretación de grandes volúmenes de datos genómicos y la integración de estos hallazgos en la práctica clínica requieren experiencia y capacitación adecuada por parte del personal de salud, por lo que es importante contar con un equipo multidisciplinario de profesionales en distintas ramas que aporten desde su área del conocimiento soluciones y nuevas estrategias. Además, los costos asociados con el WGS pueden ser un factor limitante para su implementación generalizada en todos los entornos de atención en salud, sin embargo Colombia está a la vanguardia dentro de los países latinoamericanos, ya que cuenta con centros hospitalarios que vienen implementando el uso de esta tecnología en su rutina diagnóstica como por ejemplo el Hospital Pablo Tobón Uribe de la ciudad de Medellín (INS, 2019).

En conclusión, la secuenciación de genoma completo se ha convertido en una herramienta diagnóstica de gran relevancia en el abordaje de las Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. Su integración en la práctica clínica puede mejorar significativamente la capacidad de diagnóstico y el manejo de las infecciones nosocomiales, contribuyendo a la seguridad y calidad de la atención médica.

3.Estado del arte

Las enfermedades infecciosas asociadas a bacilos Gram negativos han marcado momentos relevantes en la historia de la microbiología y salud pública, es el caso de *Klebsiella pneumoniae* (Bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, lactosa positivo, formador de cápsula), que hace parte de la microbiota normal del intestino y tracto respiratorio de humanos y animales, fue descrita por primera vez en 1882 por el patólogo y microbiólogo Karl Friedländer, lo que durante muchos años le valió la denominación de bacilo de Friedländer. Actualmente es uno de los microorganismos considerados de gran importancia clínica, debido a su capacidad de colonizar, invadir y causar infecciones del tracto urinario, neumonía, infecciones de heridas quirúrgicas e infecciones potencialmente mortales como endocarditis y septicemia (Echeverri Toro & Cataño Correa, 2010; Velásquez et al., 2013; Vera-Leiva et al., n.d.); Lina & Zulma, 2000). Las infecciones causadas por este patógeno son frecuentemente asociadas con altas tasas de mortalidad, largas estancias hospitalarias y altos costos. Adicionalmente, este microorganismo ha sido destacado por la Organización Mundial de la Salud como una de las bacterias multidrogorresistentes de alta prioridad debido a su capacidad para acumular y diseminar genes de resistencia a los antibióticos de uso comercial y hospitalario, lo cual ha reducido notablemente la efectividad de los tratamientos de primera mano, constituyéndose en un gran reto en el campo médico.

El problema de resistencia antimicrobiana se hace aún mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo verticalmente a su descendencia y además actuar como donador de elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones a través de mecanismos de conjugación o transducción hacia otras cepas o especies diferentes (Woodford *et al.*, 2011) como es el caso de *K.Pneumoniae*.

Entre los mecanismos de resistencia antimicrobiana descritos para bacterias Gram negativas se encuentran: la codificación de enzimas hidrolizantes, modificación del sitio de acción o blanco del antimicrobiano, disminución de la permeabilidad de la pared celular al

ingreso del antimicrobiano y activo eflujo del antimicrobiano hacia el exterior de las células sin modificaciones (Valenzuela *et al.*, 2003).

El principal mecanismo de resistencia a los antibióticos betalactámicos de *K.pneumoniae* es el enzimático, debido a la producción de betalactamasas, que por su perfil hidrolítico y prevalencia han tenido mayor relevancia clínica en la primera década del siglo XXI, generando resistencia a cefalosporinas de tercera generación como las betalactamasas de espectro extendido (*BLEE*), las betalactamasas de tipo *AmpC* y las carbapenemasas. El tratamiento antimicrobiano actualmente más utilizado en centros hospitalarios en casos de IAAS se basa en el uso de antibióticos carbapenémicos en monoterapia o asociados a otros antibióticos como aminoglucósidos (Oteo *et al.*, 2014), lo cual disminuye sustancialmente las posibilidades de encontrar una terapia antibiótica asertiva debido al incremento en la resistencia a los fármacos utilizados en mono terapia o terapias recombinantes por fenómenos como la inducción de presión selectiva o el incremento de las concentraciones mínimas inhibitorias a causa de una exposición prolongada a una determinada dosis antibiótica y a su vez genera la necesidad de crear mecanismos que permitan controlar de manera eficiente el problema (Echeverri Toro & Cataño Correa, 2010)

En los últimos años, se ha observado la aparición y diseminación a nivel mundial de cepas capaces de producir enzimas que confieren resistencia a betalactámicos, especialmente mediante genes asociados a elementos genéticos móviles o plásmidos. Uno de los mayores retos a enfrentar por parte de los servicios de salud ha sido la diseminación progresiva de genes codificantes de carbapenemasas, especialmente los descritos como genes *KPC*, los cuales son una familia de genes capaces de codificar enzimas hidrolizantes que actúan sobre el grupo de los antibióticos carbapenémicos que reducen o inhiben completamente el efecto de este tipo de fármacos. Posterior a la primera descripción, en el año de 1996 en Estados Unidos, de cepas de *Klebsiella pneumoniae KPC* provenientes de aislados clínicos, se han reportado en aislados provenientes de países de Europa, Medio oriente, África, Oceanía América Central y del sur, según informes realizados por parte de organizaciones como la Organización Mundial de la Salud y la organización panamericana de la salud(OPS), que estiman que su diseminación ha sido progresiva a nivel mundial (Nordmann, 2014;David *et al.*, 2019;Zhaoyinqiang Li *et al.*, 2022;Martínez *et al.*, 2016;Vargas *et al.*, 2022).

En la actualidad se han descrito no menos de 24 alelos del gen *bla*_{KPC}, los que difieren entre sí por 1- 3 aminoácidos, lo cual determina sus propiedades cinéticas, por lo que pueden presentar diferencias en la eficiencia hidrolítica de los carbapenémicos y de otros antimicrobianos betalactámicos como por ejemplo cefalosporinas, penicilinas y aztreonam (Falco *et al.*, 2017). Las variantes *KPC-2* y *KPC-3* son las más comunes entre los aislados clínicos y son consideradas responsables de brotes epidémicos (Chen *et al.*, 2015), siendo *KPC-2* la enzima predominante en el mundo, con brotes informados en E.U.A., Europa y China, mientras que *KPC-3* ha sido principalmente detectada en E.U.A., Israel y América Latina (Lee *et al.*, 2017).

En América del Sur el primer reporte de *KPC-2* ocurrió en Colombia en el año 2005 en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* en la ciudad de Medellín (Villegas *et al.*, 2006). Desde esa fecha y según reporta el sistema Nacional de Vigilancia en Resistencia a los Antimicrobianos la resistencia a carbapenémicos mediada por genes tipo *KPC* se ha diseminado a varias especies de enterobacterias en múltiples hospitales de Colombia. En el año 2011, se publicó el primer reporte de un brote de *KPC-3* en Colombia descrito en un centro hospitalario del país. Posterior en un reporte de experiencias clínicas en la ciudad de Medellín – Colombia sobre el periodo 2008 - 2011, se menciona que al realizar estudios mediante técnicas moleculares como polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción y secuenciación, en 52 pacientes identificados con infección por *K. pneumoniae KPC*, estos confirmaron la presencia del gen *KPC-3* en diferentes aislamientos, el cual fue genéticamente similar al secuenciado previamente en una cepa de origen clínico en Israel involucrada en múltiples brotes nosocomiales en ese país. El 7,6% de los pacientes analizados eran extranjeros (de Ucrania e Israel), dejando en evidencia la migración y rápida diseminación del microorganismo (Montufar *et al.*, 2015). En la actualidad países como Colombia realizan estudios basados en secuenciación de genoma completo para determinar las características epidemiológicas y de resistencia de este tipo de microorganismos en centros hospitalarios del país como los realizados por Ocampo (2016) en el cual se identifican los principales secuenciotipos de *Klebsiella pneumoniae KPC* asociados a IAAS circulantes en Colombia relacionados con la diseminación de genes *KPC* inter especies bacterianas dentro del territorio nacional y otro que establece que los genes *KPC* en Colombia se han diseminado por hospitales de todo el territorio nacional, y que los de mayor circulación son los tipo *KPC-3*. (Merchán *et al.*, 2021). Actualmente, la presencia de cepas productoras de *KPC-2* y *KPC-3* se ha

convertido, según el doctor Rafael Cantón perteneciente a la Organización Mundial de la salud en su última actualización en Junio del año 2023, en un problema endémico en países como Colombia ; Cantón .,2023).

En conclusión, la diseminación de genes *KPC* especialmente *KPC-2* y *KPC-3* en el territorio nacional ha sido progresiva lo cual implica nuevos retos diagnósticos, además de la necesidad implícita del país para mantener protocolos actualizados y dirigidos para este tipo de microorganismos basados en la información genómica.

4. Justificación

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los principales retos de salud pública a los que se enfrenta actualmente la humanidad, esta se asocia a posibles causas como el incremento de los índices de resistencia antibiótica por mutación, adquisición o pérdida de elementos genómicos asociados al resistoma bacteriano. En 2017 la OMS publicó la lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos, donde *Klebsiella pneumoniae* figura dentro del grupo de prioridad crítica, gracias a características como la facilidad para adquirir plásmidos asociados a la codificación de mecanismos de resistencia como bombas de eflujo o de enzimas que pueden inactivar grupos de antibióticos como el de las Betalactamasas; por ser considerada especialmente peligrosa en hospitales, al ser la causa común de infecciones en poblaciones susceptibles como ancianos, neonatos, pacientes inmunodeprimidos, así como aquellos pacientes que requieren dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos (Organización Mundial de la Salud, 2017). En Colombia, el INS ha reportado un porcentaje aproximado de aislamiento del 15% para *K. pneumoniae* en servicios intrahospitalarios, especialmente en unidades de cuidados intensivos (Instituto Nacional de Salud, 2019). En vista de la reducción en la efectividad de un número considerable de antibióticos de diversas familias como la de los Beta-lactámicos, Fluoroquinolonas y Aminoglucósidos dentro de las cuales se encuentran antibióticos como los carbapenémicos considerados la primera línea de tratamiento para combatir IAAS asociadas a este microorganismo.

Por tanto se hace imperiosa la necesidad de realizar la caracterización del resistoma, conformado por todos los genes asociados a la codificación de elementos de resistencia, de *K. pneumoniae* KPC, ya que según el INS en Colombia se ha incrementado el aislamiento progresivo de dicho microorganismo en el territorio nacional, haciendo que estudios el presente que forma parte del macroproyecto “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, código 110189666234, contrato 737-2018 (aprobado por el comité de ética del hospital según acta: CEI-comp-2019-09-03.son), sean necesarios para comprender las variaciones en resistencia, diversidad y diseminación de esta bacteria en el ámbito clínico, con el fin de prevenir su diseminación y definir acciones que mejoren el uso de los antimicrobianos disponibles.

5. Pregunta de investigación

¿Cuál es comportamiento epidemiológico y la variación en los perfiles genómicos y fenotípicos de resistencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en el Hospital Universitario Nacional de Colombia durante el año 2020?

6. Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el comportamiento epidemiológico y la variación de los perfiles genómicos de resistencia a antibióticos de cepas *KPC* de *Klebsiella pneumoniae*, provenientes de aislamientos clínicos del Hospital Universitario Nacional, mediante Secuenciación de Genoma Completo (WGS).

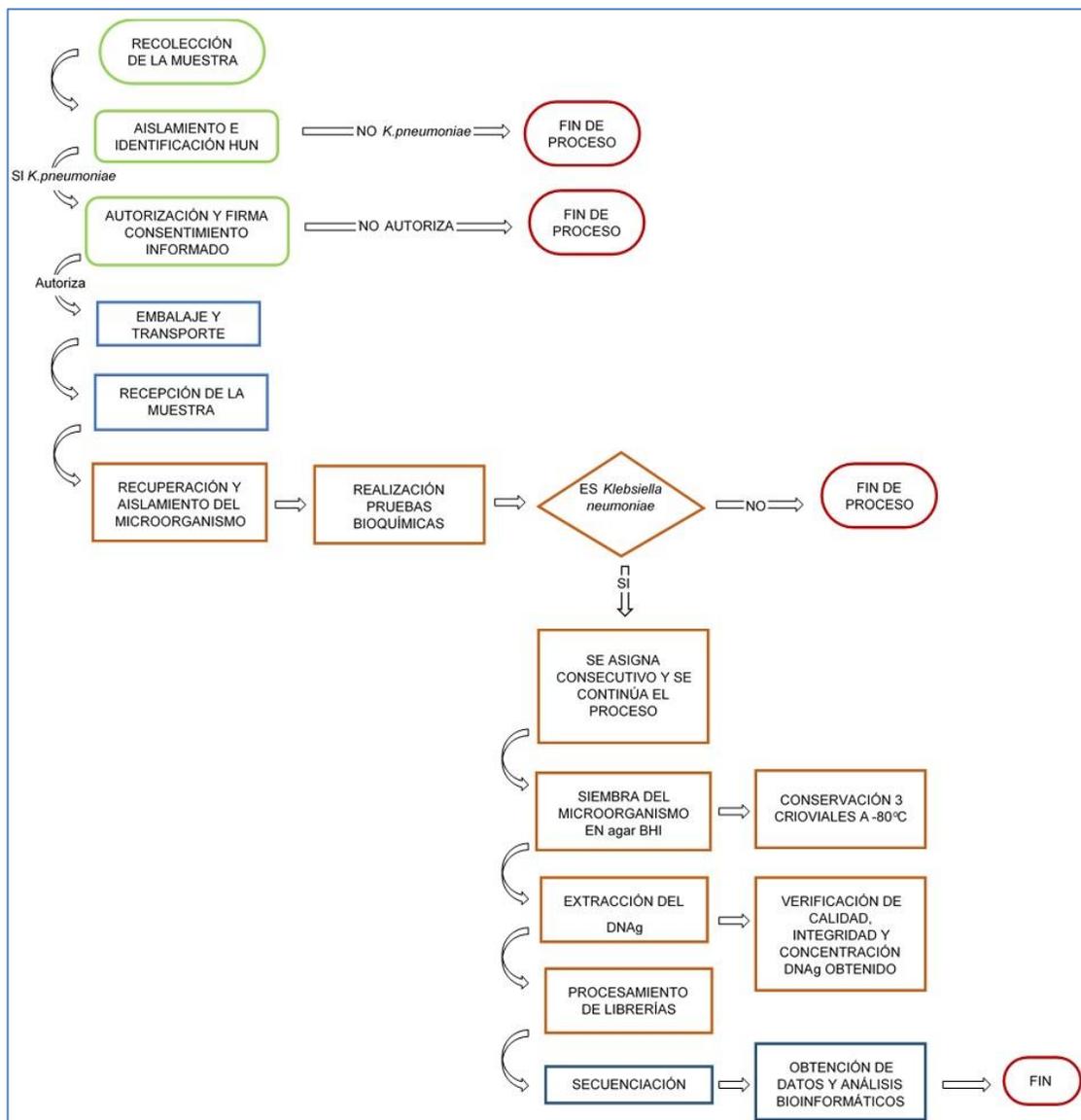
5.2 Objetivos específicos

- Obtener la información genómica de las cepas *KPC* de *Klebsiella pneumoniae*, causantes de infecciones intrahospitalarias provenientes de aislamientos clínicos del Hospital Universitario Nacional de Colombia
- Establecer las relaciones epidemiológicas con base en la información genómica obtenida de cada una de las cepas de *K. pneumoniae* que hacen parte del estudio.
- Establecer cuáles son los elementos genómicos asociados a los mecanismos de resistencia y su influencia sobre el perfil de resistencia de las cepas de estudio.

7. Metodología

El procesamiento de las muestras en el laboratorio se llevó a cabo siguiendo el flujograma que se presenta en la Figura 1. Las muestras fueron obtenidas en el Hospital Universitario Nacional y procesadas en el Laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá D.C.

Figura 1. Flujo de trabajo en el laboratorio



7.1 Selección de pacientes, origen de los aislamientos bacterianos y firma de consentimientos informados en el Hospital Universitario Nacional

El criterio de selección de los pacientes implicados en el presente estudio fue en primera instancia el estar internado en uno de los servicios de la institución hospitalaria y finalmente ser diagnosticado con una Infección Asociada a Atención en salud de cualquier tipo, además de contar con el reporte emitido por parte del laboratorio clínico donde se indicaba que el paciente podría tener una presunta infección asociada a *Klebsiella pneumoniae* KPC.

Este estudio interinstitucional de carácter Prospectivo-Descriptivo fue aprobado por el comité de ética por medio del acta CEI-HUN-acta-2019-10 y además se adhirió a los parámetros legales establecidos por parte del Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia, donde se establece la socialización y firma de un documento de consentimiento informado (Anexo 1) para el uso de material biológico de origen humano, además de autorizar el uso y tratamiento de datos personales y clínicos de cada paciente. Dicho consentimiento informado fue redactado y aprobado con el apoyo y guía del comité de ética de la institución hospitalaria y posteriormente archivado en la oficina del grupo de investigación.

7.2 Identificación, aislamiento y recolección de muestras en el Hospital Universitario Nacional

Las muestras fueron recolectadas en los diferentes servicios del Hospital Universitario Nacional (HUN): Hospitalización, unidad de cuidados intensivos (UCI) y unidad de cuidados intermedios (UCIN). El equipo de laboratorio clínico del HUN realizó la primera siembra de acuerdo a la procedencia y tipo de la muestra (sangre, secreción orotraqueal, hueso, orina, entre otros) para determinar si había crecimiento bacteriano después de 24 a 72 horas de incubación. Con lo anterior se procedió a realizar una tinción de Gram y seleccionar los reportados como bacilos Gram negativos, estos se llevaron los paneles específicos: NID (Negative Identification) para identificación y NMIC-101 para antibiograma mediante el sistema automatizado Phoenix 100 de la casa comercial Becton Dickinson. Una vez identificado el microorganismo como *Klebsiella pneumoniae* posible productora

de carbapenemasas, la institución hospitalaria remitió dichas muestras a un laboratorio de referencia, encargado de realizar el test de Hodge modificado mediante el cual se evidencia fenotípicamente la inhibición de la efectividad de antibióticos carbapenémicos, una vez realizada esta confirmación se realizó el aislamiento y siembra de la muestra en un medio de cultivo primario (agar nutritivo), una vez verificado el crecimiento después de 24 horas se depositó en el medio de transporte AMIES GEL con hisopo de rayón marca Copan, con carbón activado cuya función es reducir el crecimiento de la microbiota acompañante e incrementar el tiempo de conservación en éste medio (Figura 2).

Figura 2. Medios de transporte de muestras provenientes del Hospital Universitario Nacional



7.3 Embalaje y Transporte

Los medios de transporte con las respectivas muestras fueron llevados hasta las instalaciones del laboratorio de Epidemiología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia de acuerdo al protocolo establecido por el Hospital Universitario Nacional. Se transportaron dichos medios en empaque absorbente como protección inicial, luego se dispuso dentro de una bolsa plástica con sello adhesivo de seguridad y finalmente se depositaron en una caja plástica destinada para el transporte de material de riesgo biológico, embalada en un sobre de manila con protección de burbujas plásticas. En el

mismo sobre se incluyeron el formato de consentimiento informado de cada paciente (Anexo 1), los formatos de seguimiento (Anexo 2) y el antibiograma realizado mediante el equipo automatizado BD Phoenix, reportando las MIC (concentración mínima inhibitoria) para cada antibiótico de elección en el Hospital Universitario Nacional.

7.4 Recuperación y aislamiento del microorganismo

7.3.1 Recuperación

Para la recuperación del microorganismo en el Laboratorio de Epidemiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, se dispuso de dos tipos de medio de cultivo: Caldo Infusión Cerebro Corazón (caldo BHI) y Agar Infusión Cerebro Corazón (Agar BHI) de la casa comercial OXOID(OXOID. (s.f.); MEDIOS DE CULTIVO DESHIDRATADOS., 2019; Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología - Lopardo *et. al.*.,2023). Se realizó una inoculación de la muestra en el agar BHI y se llevó a incubación por 24 horas a 37°C. Al finalizar el tiempo de incubación se realizó nuevamente una tinción de Gram para determinar si el microorganismo obtenido era un bacilo Gram negativo y de ser este el caso, se procedió con su aislamiento en un medio selectivo para evidenciar de forma macroscópica las características metabólicas y crecimiento, proceso que se realizó con cultivos puros. De otra parte, si la tinción de Gram obtuvo visualización de cocos Gram positivos o bacilos Gram positivos, la muestra fue descartada.

7.4.2 Aislamiento

Posterior a las primeras 24 horas de incubación, el inóculo inicial se transfirió a Agar MacConkey, medio selectivo para bacterias Gram negativas que permite identificar características macroscópicas-fenotípicas como la fermentación de lactosa (Ordóñez Smith, 2014; Gelle & Field, 2012) que se puede observar mediante la variación de pH en el medio el cual se puede identificar por el cambio de color en el mismo, tomando una

tonalidad rosada rojiza, además por la producción de lipopolisacáridos permite clasificar las cepas como mucoides (convexas de bordes irregulares) e hipermucoideas (no se distinguen bordes), característica importante para realizar la estandarización del método de extracción de ADNg de *Klebsiella pneumoniae* (OXOID. (s.f.). (MEDIOS DE CULTIVO DESHIDRATADOS., 2019)

7.5 Pruebas Bioquímicas

Una vez recuperadas los aislamientos se realizaron cuatro baterías bioquímicas básicas para enterobacterias, que permitieron evidenciar con mayor claridad el metabolismo del microorganismo (Figura 3), que se describen a continuación:

Figura 3. Baterías bioquímicas para enterobacterias



Nota: De izquierda a derecha: Citrato Simmons, Urea, TSI y SIM

- Triple Azúcar Hierro TSI (Triple Sugar Iron), fermentación de lactosa como fuente de carbono en el medio. TSI agar control ácido/ácido (A/A) (se evidencia viraje de color en el medio debido a la acidificación del mismo y producción de gas debido a la fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa), TSI agar control alcalino/alcalino (K/K) (indicativo de la alcalinización del medio al no haber fermentación de los azúcares presentes en el mismo).

-
- Simmons citrato, control positivo (se evidencia viraje de color de verde a azul del medio por la utilización del citrato como fuente de carbono).
 - Urea, reducción de la urea como fuente de energía, se interpreta como urea agar control negativo (se evidencia viraje de color en el medio a color amarillo indicador de acidificación en el medio lo que responde al uso de azúcares presentes), Urea agar control positivo (se evidencia por la acción de la enzima ureasa que degrada la urea presente produciendo amoníaco y dióxido de carbono lo que alcaliniza el medio haciendo virar el indicador rojo fenol a fucsia).

SIM (Sulfuro Indol Motilidad), SIM Agar tubo negativo (no se evidencia motilidad, producción de sulfuro o prueba de indol positiva), SIM agar tubo positivo para motilidad y finalmente indol, evidenciado por la adición de reactivo de Kovacs al medio y mediado por la producción de triptofanasas capaces de metabolizar indol

(OXOID. (s.f.); MEDIOS DE CULTIVO DESHIDRATADOS., 2019; Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología – Lopardo *et. al.*., 2023)

7.6 Ingreso a base de datos

Los datos de identificación de cada muestra, el perfil de resistencia suministrado por el hospital y de la historia clínica de los pacientes fueron ingresados en el Sistema de Gestión de Información Genómica y Clínica (SGIGC), desarrollado por el Grupo de Bioinformática del Instituto de Biotecnología, el cual fue usado para la integración y análisis de datos genómicos, microbiológicos y clínicos.

7.7 Conservación de los aislamientos e ingreso al cepario.

Una vez confirmada la identidad del microorganismo *Klebsiella pneumoniae* se llevó a cabo el proceso de conservación de los 37 aislamientos en tres crioviales a -80°C los cuales se almacenaron en el cepario del Instituto de Biotecnología y del laboratorio de EPIMOL y un criovial de trabajo a -20°C en medio de conservación SKIMMED MILK POWDER (OXOID. (s.f.). (MEDIOS DE CULTIVO DESHIDRATADOS, 2019) que por sus características permiten a futuro la recuperación de los mismos. Cabe resaltar que del mismo agar BHI se toman dos inóculos uno para conservación y el otro para ser analizado genómicamente, esto con el fin de asegurar la trazabilidad.

7.8 Extracción de ADN genómico

Una vez asegurada la calidad, pureza y clasificación de las cepas como mucoides o hipermucoides se llevó a cabo la extracción de ADNg en el laboratorio usando el kit comercial *PureLink Genomic DNA Mini Kit* de la casa comercial Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc., 2021). La calidad del ADN obtenido se evaluó mediante Nanodrop, para evaluar la pureza de DNA a través de las lecturas de las relaciones de absorbancia 260/280, así como también las lecturas de la relación 260/230 (Thermo Fisher Scientific Inc., 2021).

La concentración de DNAg obtenido se evaluó mediante método fluorométrico con el instrumento Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc., 2021). Adicionalmente, para evaluar la pureza e integridad del ADNg, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1%) la cual fue resuspendida en buffer TBE a 0,5X utilizando el tinte altamente sensible para visualización de ADN en geles de agarosa *SYBR safe*, el proceso de electroforesis se realizó a 80 voltios durante 20 minutos, la visualización del resultado se hizo mediante el foto documentador marca xxxx usando del programa IMAGE LAB 5.2.1. Es importante recalcar que las muestras se montaron llevando cada una de ellas a concentración estándar de 10 ng/ μl .

7.9 Preparación de librerías para secuenciación

El montaje de librerías para secuenciación se realizó con el kit comercial *Illumina DNA prep* para 24 muestras, con el cual se dispone de 24 combinaciones posibles para el uso de los *index*. Para la obtención de librerías, las muestras fueron tratadas según las instrucciones del fabricante estableciendo una concentración de entrada de 300ng de ADNg en 30µl para lo cual se realizó la dilución de las muestras en agua destilada HPLC tipo I libre de nucleasas como punto de partida, los *index* fueron asignados de forma individual para cada una de las muestras (Illumina, mayo de 2018; Illumina, mayo de 2019) (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de los *index* utilizados para la generación de librerías

Index	Secuencia	Secuencia adaptadora
H503	TATCCTCT	TATCCTCT
H505	GTAAGGAG	GTAAGGAG
H506	ACTGCATA	ACTGCATA
H517	GCGTAAGA	GCGTAAGA
H710	CGAGGCTG	CAGCCTCG
H705	GGA CTCTCT	AGGAGTCC
H706	TAGGCATG	CATGCCTA
H707	CTCTCTAC	G TAGAGAG
H711	AAGAGGCA	TGCCTCTT
H714	GCTCATGA	TCATGAGC

La concentración de las librerías se midió con método fluorométrico mediante Qubit (Thermo Fisher Scientific Inc., 2021). ; y el tamaño promedio de fragmento para cada librería se evaluó utilizando el analizador de fragmentos Bioptic QSep100 (Bioptic Inc, 2016).

7.10 Secuenciación

Para llevar a cabo la secuenciación, inicialmente las muestras fueron normalizadas a una concentración de 4nM para lograr una mezcla equimolar o pool que se llevó finalmente a una concentración de 12 pM previo a su desnaturalización, proceso que consiste en romper las cadenas dobles de DNA y llevarlas finalmente a cadenas sencillas para continuar con la secuenciación, utilizando el KIT de secuenciación MiSeq Reagent Kit v3 para realizar una secuenciación de extremos pareados (2x300pb) en el secuenciador

Illumina Miseq (Figura 4). El montaje del pool final de librerías en el cartucho de secuenciación, desnaturalización y programación del equipo, se realizó según las instrucciones del fabricante (Illumina, mayo de 2019; Illumina, mayo de 2018).

Figura 4. Secuenciador Illumina Miseq perteneciente al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá



7.11 Análisis bioinformático

- **Evaluación de la calidad y procesamiento de las lecturas.** La calidad de las lecturas se analizó mediante el programa FastQC v 0.11.5. (Andrews, 2016). Posteriormente se realizó una depuración de lecturas de baja calidad generadas durante la secuenciación, así como secuencias de adaptadores, usando el programa Trimmomatic v. 0.36 (Bolger *et al.*, 2014).
- **Ensamblaje.** El ensamblaje *de novo* de los genomas de los aislamientos de *K. pneumoniae* se hizo con el programa SPAdes v 3.8 (Xavier *et al.*, 2014), utilizando los *k-mers* por defecto. La calidad de los genomas ensamblados se analizó mediante la herramienta QUAST (Gurevich, Saveliev, Vyahhi, & Tesler, 2013).
- **Anotación genómica.** Los genomas ensamblados fueron anotados utilizando Prokka (Bermudez-Santana, 2016), (Zhang, Chiodini, Badr, & Zhang, s/f). Se hizo uso del

software Roary v 1.0 (Page *et al.*, 2015) con el fin de hacer la comparación entre los genomas obtenidos y finalmente el resistoma se obtuvo mediante la herramienta RGI (por sus siglas en inglés *Resistome genome identifier*) de la base de datos CARD (por sus siglas en inglés *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) con el fin de identificar genes existentes y putativos asociados a resistencia antibiótica. Las secuencias se organizaron y clasificaron por ontología de secuencia, lo cual proporcionó diferentes niveles de organización y relaciones entre secuencias (Alcock BP *et. al* 2022).

- **Generación de árboles de máxima verosimilitud.** Los árboles genómicos fueron construidos a partir del análisis de variaciones/polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs cuya alineación y anotación se realizó por medio Snippy-core, un programa que permite encontrar SNPs entre un genoma de referencia en este caso el genoma de referencia utilizado fue HNS11286 y lecturas de secuencias obtenidas mediante NGS (Hernández *et al.*, 2020) lo cual permitió agrupar a cada uno de los aislamientos según sus variaciones genómicas, estos datos fueron utilizados para generar un árbol filogenético basado en el algoritmo de máxima verosimilitud haciendo uso del programa RAxML v8.2.4 (Simmons & Goloboff, 2014), además del uso de MLST (*MultiLocus Sequence Typing*) que se basa en el análisis de secuencias parciales de una serie de genes conservados, como herramienta para establecer los grupos clonales o ST /secuenciotipos por medio de la búsqueda de los mismos en la base de datos PubMLST, la visualización de los datos obtenidos se realizó por medio de la herramienta Web iTOL v6 (Letunic & Bork, 2021) . También se hizo uso de ANI (*Average Nucleotide Identity*), una medida obtenida a partir de un cálculo que permite evaluar la similitud genómica a nivel de nucleótidos de las secuencias entre las regiones codificantes de dos genomas (Hernández *et al.*, 2020).

8. Resultados y Discusión

8.1 Identificación del microorganismo y características epidemiológicas

Para este estudio se seleccionaron 41 aislamientos clínicos provenientes del Hospital Universitario Nacional de Colombia, consistentes con *Klebsiella pneumoniae* KPC. En la Figura 5 se muestran las características macroscópicas para *K. pneumoniae* (bacteria Gram negativa) en agar MacConkey donde se observa el cambio de color del medio tomando una tonalidad rosada rojiza debido a la variación del pH en el medio, así como la producción de lipopolisacáridos que permite clasificar las cepas como mucoides, convexas de bordes irregulares (Figura 5-a) e hipermucoides (Figura 5-b) en la cual no se distinguen bordes, características de importancia para estandarizar el método de extracción de ADN del microorganismo (Nájera de Herazo, 2018).

Figura 5. *Klebsiella pneumoniae* en agar MacConkey



Se observó que el 37,71% de los aislamientos presentaron un fenotipo mucóide y el 62,29% fueron hipermucoides. Estos últimos se asocian a cepas de *K. pneumoniae* hipervirulentas (Kphv) capaces de causar infecciones severas y potencialmente mortales en pacientes sanos e inmunodeprimidos. El fenotipo hipermucoviscoso de Kphv se caracteriza por la presencia de cápsula y lipopolisacárido como elementos de virulencia,

los cuales favorecen el incremento de material capsular y la producción de biopelícula permitiéndole al microorganismo evadir de manera efectiva el sistema inmunológico del hospedero susceptible (Varela *et al.*, 2020). Anteriormente se consideraba que este patotipo no acarrea problemas de resistencia antibiótica, pero con la diseminación global de elementos genéticos móviles que confieren características de resistencia, se ha comenzado a describir asociado a la presencia de BLEE o carbapenemasas (Lee *et al.*, 2017). El hallazgo de aislamientos hipermucoides en este trabajo da pie a realizar posteriores investigaciones de los factores de virulencia con el fin de evitar la dispersión de clones hipervirulentos y multirresistentes en el HUN.

En la Figura 6 se muestran las baterías bioquímicas realizadas para la confirmación de *K. pneumoniae*: A. batería SIM, falta de movilidad en el medio, no producción de sulfuro (el medio no se torna de color negro) y la no se produce indol (que al adicionar reactivo de Kovacs no produjo el característico color rojo cereza en el medio), B. batería TSI, fermentación de lactosa lo que produce acidificación del medio haciendo que este se torne amarillo (se reporta como A/A) (OXOID. (s.f.); MEDIOS DE CULTIVO DESHIDRATADOS., 2019; Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología - Lopardo *et. al* 2023) C. batería UREA, el medio se torna rosado (urea positivo) debido a la acción hidrolítica de la enzima ureasa la cual acidifica la urea presente en el medio produciendo cambio de color, D. batería CITRATO SIMONS, *K. pneumoniae* utiliza el citrato como única fuente de carbono presente en el medio, lo que produce el viraje de verde a azul. (OXOID. (s.f.); MEDIOS DE CULTIVO DESHIDRATADOS., 2019; Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología - Lopardo *et. al* 2023; Nájera de Herazo, 2018)

Figura 6. Baterías bioquímicas para *Klebsiella pneumoniae*

Posterior al análisis de baterías bioquímicas, se observó que cuatro aislamientos no correspondían con las características metabólicas descritas para *K. pneumoniae*, por lo cual fueron descartadas del estudio obteniendo un total de 37 aislamientos finales.

En el Anexo 3 se presenta el compendio de los datos epidemiológicos relevantes, extraídos de las historias clínicas de cada paciente. Con relación al origen de la muestra, el mayor número de aislamientos fue recuperado a partir de hemocultivo (39,02%), seguido de urocultivo (24,39%), mientras que el 10% procedían de otras fuentes como, líquido peritoneal, lavado broncoalveolar, hueso vertebral, tejido de columna, secreción de columna, hueso sacro, absceso de herida abdominal, catéter venoso, tejido granuloso de cuello y secreción orotraqueal. Estos datos concuerdan con lo mencionado por Rodríguez et. al (2014), quienes indican que *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos fue el causante del 20 al 30% de IAAS a nivel respiratorio en la ciudad de Bogotá, determinando también que fue el patógeno más aislado en muestras de sangre, atribuyéndole para el período de 2014 una tasa de mortalidad del 50% tras su aislamiento.

Respecto al pabellón donde se presentaron las IAAS, el 46,34% ocurrió en el servicio de UCI; 34,15% en hospitalización y 12,20% en UCIN; resultados similares son reportados por el INS que menciona que la mayor ocurrencia de aislamientos de *K. pneumoniae* durante 2019 se presentó en el servicio de UCI (17,4%), seguido por el servicio de hospitalización (12,1%) (INS, 2019).

Por otra parte, los porcentajes de aislamientos según los grupos etarios mostraron que el 63,16% procedieron de pacientes mayores de 60 años y el 36,84% de pacientes menores de 60 años. Al respecto, Pardo (2019) en un estudio de caracterización epidemiológica en el Hospital del Caribe, encontró que los pacientes mayores de 55 años presentan la mayor susceptibilidad a las IAAS (47%). Además, el informe epidemiológico del INS para el primer trimestre del año 2022 reportó el 18,1% de IAAS en personas adultas mayores de 40 años.

En cuanto al género de los pacientes, el 52,63% de las muestras fueron obtenidas de hombres y 47,37% de mujeres. Finalmente, de acuerdo a las historias clínicas el 62,5% de los pacientes fueron dados de alta, el 4,17% permaneció hospitalizado, mientras que el 33,33% fallecieron.

En cuanto al tipo de IAAS se observó que el 81,25% fueron intra institucionales, mientras que el 18,75% fueron extra institucionales. Este apartado se discutirá más adelante con la circulación de secuenciotipos.

7.1.1 Evaluación de sensibilidad a antibióticos

Las pruebas de susceptibilidad a antibióticos arrojados por el equipo automatizado BD Phoenix TM revelaron que el 51,35% (19/37) de las cepas de *K. pneumoniae* analizadas eran multidrogorresistentes (MDR), es decir que mostraron resistencia a al menos un agente perteneciente a tres o más categorías de antibióticos (Jiménez *et al.*, 2019). En la Tabla 2 se puede observar el antibiograma de cada una de las cepas, así como el porcentaje de resistencia a diferentes antibióticos para cada una de ellas.

Tabla 2. Antibiograma de cada uno de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* realizado con el equipo BD Phoenix

Aislamiento	Betalactámicos											Aminoglucósidos				Fluoroquinolonas			Tetraciclinas			Otros		Resistencia (%) *
	AMC	ATM	CAZ	CRO	CXM	CFZ	FEP	FOX	IMI	MER	AMS	PTZ	ETP	C/T	CAZ/AVI	AMK	GEN	CIP	NOR	TGC	TET	TMS	NIT	
Kp001	NR	NR	R	R	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	S	S	NR	NR	NR	S	NR	39,13
Kp002	NR	NR	R	R	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	S	S	NR	NR	NR	S	NR	39,13
Kp004	R	NR	R	R	R	R	R	R	NR	R	NR	R	R	NR	NR	S	S	S	S	NR	R	S	I	47,83
Kp005	NR	NR	R	R	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	S	S	NR	NR	NR	S	NR	39,13
Kp006	NR	NR	R	R	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	S	S	NR	NR	NR	S	NR	39,13
Kp007	R	NR	R	R	R	R	R	R	NR	R	NR	R	R	NR	NR	S	S	S	S	NR	R	S	NR	47,83
Kp008**	R	NR	R	R	R	R	R	I	NR	I	NR	R	R	NR	NR	S	R	R	R	NR	R	R	NR	56,52
Kp009	R	NR	R	R	R	R	R	R	NR	R	NR	R	R	NR	NR	S	S	S	S	NR	R	S	NR	47,83
Kp011**	NR	NR	R	R	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	S	R	NR	NR	NR	R	NR	47,83
Kp012**	NR	NR	R	R	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	S	R	NR	NR	NR	R	NR	47,83
Kp013**	NR	NR	R	R	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	R	R	NR	NR	NR	R	NR	52,17
Kp014**	NR	NR	R	R	NR	R	R	I	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	R	R	NR	NR	NR	R	NR	47,83
Kp015**	NR	NR	R	R	NR	R	R	I	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	R	R	NR	NR	R	R	NR	52,17
Kp016	R	NR	NR	R	R	R	R	S	NR	R	NR	R	R	NR	NR	S	S	S	NR	NR	NR	S	NR	34,78
Kp017**	NR	NR	R	R	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	S	R	NR	NR	NR	R	NR	47,83
Kp018**	NR	NR	R	R	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	S	R	NR	NR	NR	R	NR	47,83
Kp019**	NR	NR	R	R	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	S	R	NR	NR	NR	R	NR	47,83
Kp021**	NR	NR	R	R	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	S	R	NR	NR	NR	R	NR	47,83
Kp022	R	NR	NR	R	R	R	R	S	NR	R	NR	R	R	NR	NR	S	S	S	S	NR	NR	S	NR	34,78
Kp023	R	NR	NR	R	R	R	R	S	NR	R	NR	R	R	NR	NR	S	S	S	NR	NR	NR	S	NR	34,78
Kp024**	R	NR	R	R	R	R	R	S	NR	R	NR	R	R	NR	NR	S	S	R	I	NR	R	R	NR	52,17
Kp025	R	NR	R	R	R	R	R	R	NR	R	NR	R	R	NR	NR	S	S	S	S	NR	S	S	NR	43,48
Kp026**	NR	NR	R	R	NR	R	R	S	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	R	R	NR	NR	NR	R	NR	47,83
Kp027**	NR	NR	R	R	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	NR	NR	S	S	R	NR	NR	NR	R	NR	47,83
Kp029**	NR	R	R	R	R	R	R	I	NR	I	R	R	R	R	S	S	R	R	NR	NR	NR	R	NR	56,52
Kp030**	NR	R	R	R	R	R	R	I	NR	I	R	R	R	R	R	S	R	R	NR	NR	NR	R	NR	60,87
Kp031**	NR	R	R	R	R	R	R	I	NR	I	R	R	R	R	S	S	R	R	X	NR	NR	R	NR	56,52
Kp032	NR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	X	NR	NR	S	NR	60,87
Kp033	NR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	X	NR	NR	S	NR	60,87
Kp034	NR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	I	NR	S	NR	60,87
Kp035	NR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	NR	S	NR	S	NR	60,87
Kp036	NR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	NR	S	NR	S	NR	56,52
Kp037	NR	R	R	R	NR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	I	NR	S	NR	60,87
Kp038	NR	R	R	R	R	R	S	S	NR	I	R	R	R	R	S	NR	S	S	S	NR	NR	S	NR	39,13
Kp039**	NR	R	R	R	R	R	S	S	NR	R	R	R	R	I	S	S	R	R	NR	NR	NR	R	NR	52,17
Kp040**	NR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	NR	I	NR	R	NR	69,57
Kp041**	NR	NR	R	R	NR	R	R	NR	R	R	R	R	R	NR	S	S	R	R	NR	S	NR	R	NR	52,17

Nota. AMC: Amoxicilina Clavulanato, ATM: Aztreonam, CAZ: Ceftazidima, CRO: Ceftriazona, CXM: Cefuroxima, CFZ: Cefazolina, FEP: Cefepima, FOX: Cefoxitina, IMI: Imipenem, MER: Meropenem, AMS: Ampicilina sulbactam, PTZ: Piperacilina tazobactam, ETP: Ertapenem, C/T: Ceftolozano Tazobactam, CAZ/AVI: Cetazidima Avibactam, GEN: Gentamicina, AMK: Amikacina, CIP: Ciprofloxacina, NOR: Norfloxacin, TGC: Tigeciclina, TET: Tetraciclina, TMS: Trimetropin sulfametoxazol, NIT: Nitrofurantoina, R: resistente, I: intermedio, S: susceptible, NR: no resistente, X: no reportado, * Porcentaje calculado respecto al número de fármacos evaluados, ** aislamientos MDR.

Se observaron altos niveles de resistencia a betalactámicos como ceftriazona (100%), cefazolina (100%), piperacilina tazobactam (100%), ertapenem (100%), cefepima (94,59%), ceftazidima (91,89%), meropenem (86,49%) y ampicilina sulbactam (75,68%); para otros betalactámicos como amoxicilina cluvanato, aztreonam, cefuroxima, cefoxitina, imipenem, ceftolozano tazobactam y cetazidina avibactam, menos del 62% de los aislamientos presentaron resistencia. En cuanto a fluoroquinolonas, el porcentaje más alto de resistencia fue para ciprofloxacina con el 54,05% de las cepas. En el caso de los aminoglucósidos se observó un porcentaje de resistencia de 27,03% a gentamicina. Otros antibióticos como trimetropin sulfametoxazol mostraron resistencia del 51,35% (Figura 7).

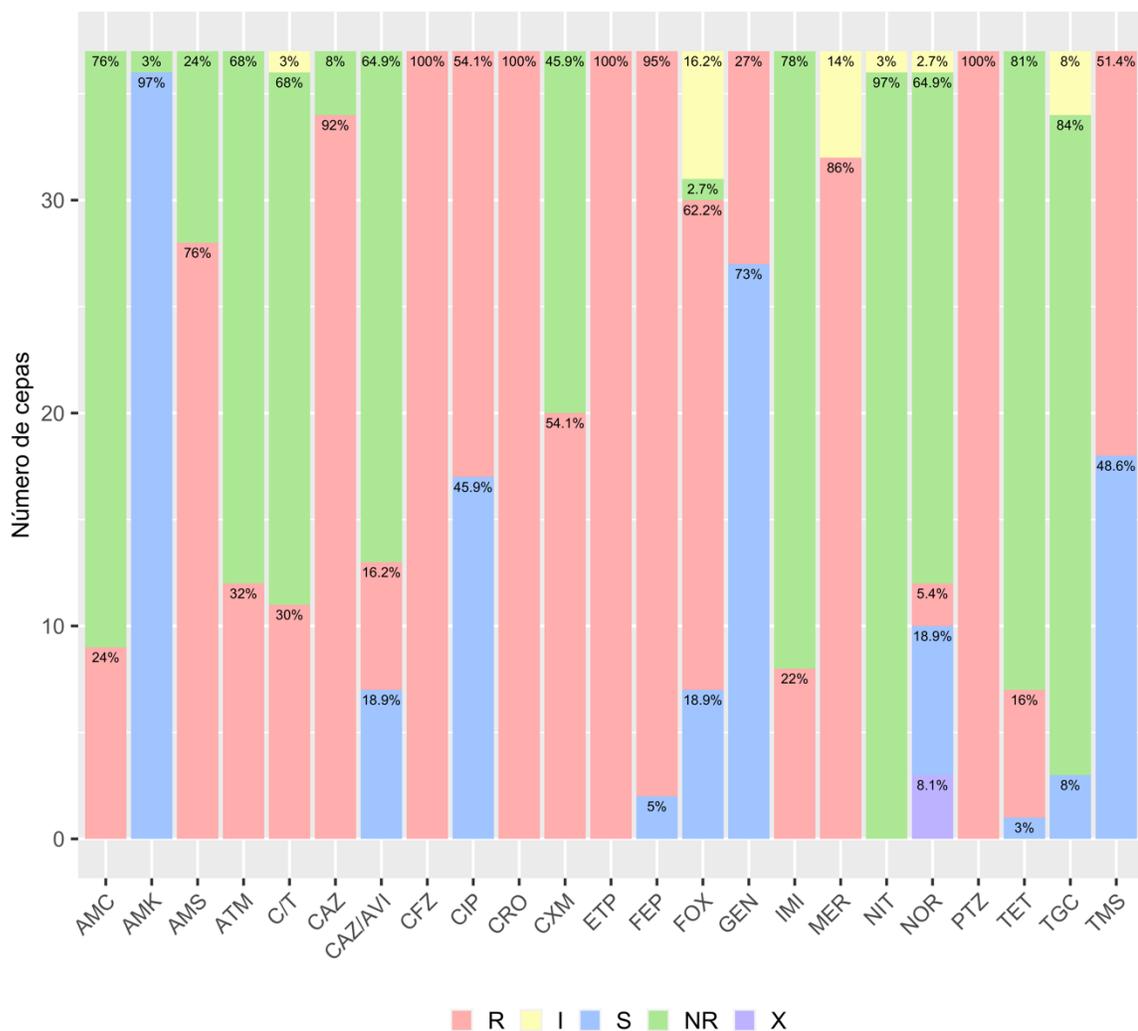
Estos resultados son consistentes con otros estudios realizados en Colombia (Rojas *et al.*, 2018; García *et al.*, 2020; De la Cadena *et al.*, 2021; Saavedra *et al.*, 2021) y en otros países (Martínez, *et al.*, 2016; Martín *et al.*, 2017; Yauri *et al.*, 2020), ya que las diferentes cepas estudiadas en general presentaron resistencia a un espectro amplio de antibióticos, especialmente a los betalactámicos (Figura 7), por lo que es importante mantener el monitoreo constante con estudios de este tipo de agentes multirresistentes a nivel intrahospitalario.

La resistencia de *K. pneumoniae* a los antimicrobianos viene en aumento. Así lo evidencia la OMS a través de sus informes del Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos y de su Uso (GLASS), según los cuales, en 2014 *K. pneumoniae* reportaba una tasa de resistencia de 30% y 11% para cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos, respectivamente; mientras que para el año 2021 se observó un incremento en dichas tasas para estos mismos grupos de antibióticos (entre 40% - 50% para cefalosporinas de tercera generación, 41% para carbapenémicos y 43,1% para fluoroquinolonas (ciprofloxacina)) (GLASS, 2014; GLASS, 2021).

.La variabilidad presente en los antibiogramas reportados se podría explicar por varios fenómenos dentro de los cuales se destacan la presión selectiva a la que haya sido sometido el microorganismo, la adquisición o pérdida de elementos genómicos de resistencia y la codificación de genes que hacen parte del resistoma cromosomal de estos microorganismos, conocidos también como genes de resistencia natural (Merchan, *et al.* 2021), aunque se han descrito nuevas evidencias de un fenómeno muy poco reportado denominado sensibilidad colateral asociado a cepas de *Klebsiella pneumoniae*, especialmente portadoras de genes *KPC-3*, dentro de las que se reporta la sensibilidad fenotípica a determinados antibióticos carbapenémicos asociada a la resistencia adquirida por medio de presión antibiótica a ceftazidima/avibactam (Cantón, 2023). La OMS (2020) menciona que la resistencia de *K. pneumoniae* al tratamiento de último recurso con antibióticos carbapenémicos como imipenem o meropenem se ha propagado a todas las regiones del mundo, reportando que en algunos países este tipo de antimicrobianos ya no son eficaces en la mitad de los pacientes con infecciones por este microorganismo, lo cual se evidenció en este estudio con las altas tasas de resistencia a carbapenémicos. Lo anterior es una señal de alerta epidemiológica teniendo en cuenta la creciente amenaza mundial que representan las enterobacterias productoras de betalactamasas resistentes a

los carbapenémicos, debido a las escasas opciones terapéuticas disponibles, y a los limitados recursos diagnósticos en Colombia para realizar una adecuada aproximación terapéutica, ya que no existe una prueba 100% sensible y específica que permita detectar de manera temprana las variaciones genéticas de los microorganismos (Esparza, 2020), por lo cual cobra gran relevancia la confirmación y caracterización de los aislados resistentes, utilizando pruebas moleculares como la secuenciación de genoma completo utilizada en este estudio, que permitió establecer la presencia de genes tanto plasmídicos como cromosómicos asociados a la resistencia que se discutirá más adelante.

Figura 7. Porcentaje de resistencia y sensibilidad a los antibióticos reportados en el antibiograma obtenido para el total de los aislamientos de estudio



Nota. AMC: Amoxicilina Clavulanato, AMK: Amikacina, AMS: Ampicilina sulbactam, ATM: Aztreonam, C/T: Ceftolozano Tazobactam, CAZ: Ceftazidima, CAZ/AVI: Cetazidima Avibactam, CFZ: Cefazolina, CIP: Ciprofloxacina, CRO: Ceftriazona, CXM: Cefuroxima, ETP: Ertapenem, FEP: Cefepima, FOX: Cefoxitina, GEN: Gentamicina, IMI: Imipenem, MER: Meropenem, NIT: Nitrofurantoina, NOR: Norfloxacina, PTZ: Piperacilina tazobactam, TET: Tetraciclina, TGC: Tigeciclina, TMS: Trimetropin sulfametoxazol, R: resistente, I: intermedio, S: susceptible, NR: no resistente, X: no reportado.

8.2 Obtención de ADNg, generación de librerías y secuenciación

El ADNg obtenido presentó en promedio una concentración de 51,88µg/ml (Tabla 3), valores que se encuentran dentro de los rangos de calidad requerida para secuenciación. De acuerdo al protocolo de Illumina DNA prep reference guide (2020), la concentración de entrada de genomas bacterianos para el montaje de librerías puede llegar a ser mínimo de 10 ng/µl, por tanto la concentración de ADNg obtenida en el laboratorio fue suficiente para hacer el montaje de las librerías genómicas.

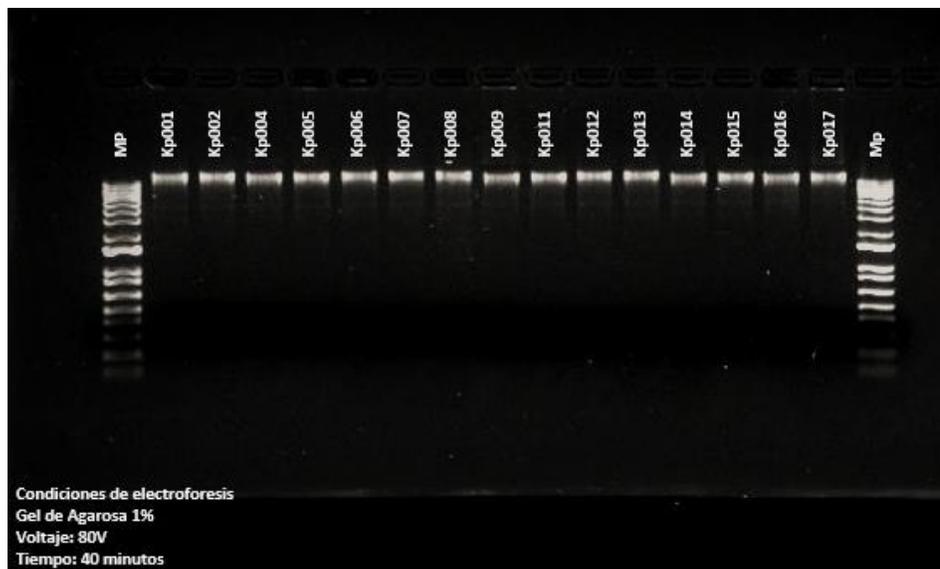
En cuanto a la calidad del ADNg, los valores obtenidos fueron 260/280 y 260/230 con promedios de 1,87 y 1,88 respectivamente (Tabla 3), se encuentran dentro los rangos de referencia (260/230 de 2.0 a 2.2 y 260/280 de 1,8 a 2,0), indicando pureza y buena calidad de la muestra obtenida, factor de gran importancia para una secuenciación exitosa, ya que una mala calidad de ADNg de entrada se traduce en librerías genómicas de mala calidad y finalmente en una secuenciación de bajo rendimiento debido a las interferencias que pueden generar los residuos como fenol, cualquier resto de proteína, ARN, sales, detergentes, guanidina (presente en las columnas de extracción y en el buffer de lavado del kit de extracción), etanol (presente en el buffer de lavado del kit de extracción), entre otros (Illumina, 2020). Las librerías genómicas tuvieron una concentración promedio de 17,18 µg/ml y un tamaño promedio de fragmento de 730pb. Dado que la calidad de ADNg se aseguró desde el inicio, las librerías obtenidas también fueron de alta calidad asegurando una secuenciación exitosa.

Tabla 3. Cantidad y calidad de ADNg y librerías para secuenciación

Consecutivo	Número paciente	DNA genómico			Librerías	
		Qubit (µg/ml)	260/280	260/230	Qubit (µg/ml)	Tamaño promedio de fragmento
Kp001	1	73,2	2	1,97	7,03	605
Kp002		20,1	1,89	1,35	10,44	651
Kp004	2	31,1	1,97	1,65	27,1	838
Kp005	3	18	1,78	1,72	6,93	486
Kp006		13,7	1,9	1,39	20,3	1011
Kp007	4	29,2	1,81	1,17	21,3	876
Kp008	5	17,1	1,8	1,88	32,5	543
Kp009	6	48,6	1,8	1,88	10,9	771
Kp011	7	16,3	1,91	1,99	18,1	424
Kp012		69,7	1,79	1,99	11,1	771
Kp013	8	29	1,76	1,4	12	666
Kp014		50,1	2	2	15	771
Kp015		80,6	1,79	1,91	11,3	771
Kp016	9	36,1	1,8	2,11	17,7	771
Kp017	10	49,9	1,77	1,93	12,5	771
Kp018		57,9	1,8	1,98	10,8	771
Kp019		56,3	1,79	1,97	9,44	771
Kp021	12	8,93	1,82	1,67	41,6	771
Kp022	13	53,1	2	2	9,88	771
Kp023		83,5	1,81	2,01	19,8	771
Kp024	14	22,8	1,8	1,98	14,9	771
Kp025	15	38,2	1,8	1,96	12,4	771
Kp026	16	41,5	1,79	1,99	9,87	771
Kp027	17	48,4	2	2	13,8	771
Kp029	18	66	1,89	2,01	16,7	771
Kp030		47,7	1,79	1,99	22	771
Kp031		48,3	1,81	1,97	17,7	771
Kp032	19	50,8	1,8	2,01	15,3	771
Kp033		27,9	2	2	13,2	698
Kp034		36,7	1,99	2	15,8	397
Kp035	20	50,6	1,98	2	19,6	656
Kp036		16,2	2	2	24,7	706
Kp037	21	62,1	2	2,1	21,5	692
Kp038	22	101	1,97	2	23,1	659
Kp039	23	27,4	1,85	1,98	14,5	686
Kp040	24	46,8	1,92	1,99	19,9	650
Kp 041	25	121	2	1,98	58,8	600

La electroforesis en gel de agarosa de los ADN_g extraídos (Figura 8), muestran bandas tamaño y peso similares, así como bandas más pequeñas y de menor peso molecular que pueden estar relacionadas con presencia ADN plasmídico; este tipo de ADN no interfiere en el proceso de secuenciación. Es importante resaltar que el ADN_g no se observa fragmentado ya que hay presencia bajo de barrido de las bandas o *smear*.

Figura 8. Electroforesis de ADN genómico en gel de agarosa al 1%



Como genoma de referencia se utilizó el clasificado según el NCBI como *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286*, perteneciente a una cepa productora de carbapenemasas proveniente de un cultivo de esputo de origen humano, aislada de un centro hospitalario en Shanghái, China y secuenciada por el Laboratorio Estatal Clave de Metabolismo Microbiano de la Universidad Jiaotong de Shanghái (NCBI, 2019). La longitud total de secuencia reportada para esta cepa es de 5,68232 Mpb y comprende un cromosoma (5,3 Mb), tres plásmidos que incluye genes asociados da resistencia a múltiples fármacos (~110 kb), de los cuales uno es portador de genes *KPC* relacionados con la producción de enzimas carbapenemasas; y tres plásmidos pequeños (~3 kb). Los tamaños de genoma obtenidos en este estudio variaron entre 5.357.853 y 5.749.582 pb, valores dentro del rango esperado para para esta bacteria. Las variaciones en el número de pb entre secuencias se puede deber a la variabilidad genómica de cada una de las cepas, por ejemplo, la cantidad de genes plasmídicos que portaba cada cepa analizada (Pinglei, Liu *et al.*, 2012). La calidad de la secuencias de los genomas obtenidos es

adecuada, considerando la profundidad de secuenciación fue de 53X a 217,2X con un promedio de 68,5X, lo cual reduce la posibilidad de errores en la secuencia genómica obtenida para cada aislamiento analizado.

Los 37 genomas de los aislamientos analizados se ensamblaron con el software SPAdes, utilizando el conjunto de *k-mers* que el programa trae por defecto, los cuales dieron los mejores resultados en términos de número *contigs* y el N50. El porcentaje de G/C se encontró entre 57,01% y 57,87% (Tabla 4), valores dentro del rango normal reportado por el NCBI para el microorganismo en estudio. Los genomas ensamblados, tuvieron valores de nN50 entre 35.263 hasta 448.457, con una media de 237.238 (Tabla 4). El promedio del nN50 es alto, lo que indica ensamblajes con pocos *contigs* y alto cubrimiento, y su variabilidad es normal en la WGS de múltiples aislamientos de bacterias como *K. pneumoniae*, ya que aunque se presupone son muy cercanos desde el punto de vista de su secuencia, las variaciones en su genoma y composición celular dan resultados variables desde la obtención del ADN a secuenciar hasta el resultado de la secuenciación en términos de cubrimiento y número de *contigs*.

Tabla 4. Características de los genomas ensamblados

Consecutivo	Antes de la Limpieza			Después de la Limpieza			N50
	Total Reads	Profundidad (X)	% GC	Total Reads	Profundidad (X)	% GC	
Kp001	921.547	99	57%	1'781.614	95,7	57%	224.687
Kp002	852.815	91,6	57%	1'640.548	88,1	57%	221.523
Kp004	656.521	70,5	57%	1'266.234	68	57%	81.635
Kp005	798.108	85,7	57%	1'529.000	82,1	57%	206.269
Kp006	773.820	83,1	57%	1'486.010	79,8	57%	190.969
Kp007	747.146	80,2	56%	1'437.852	77,2	56%	96.868
Kp008	557.777	59,9	56%	1'074.622	57,7	56%	278.175
Kp009	1'542.993	165,7	57%	2'919.064	156,7	57%	277.964
Kp011	374.234	40,2	56%	722.700	38,8	56%	221.523
Kp012	1'266.698	136	56%	2'384.714	128	56%	135.088
Kp013	637.403	68,4	55%	1'229.764	66	55%	190.978
Kp014	1041930	111,9	57%	980.874	105,3	57%	229.533
Kp015	1'016.098	109	56%	1'906.828	102,4	56%	35.263
Kp016	895.310	96	56%	1'597.810	85,8	56%	246.899
Kp017	1'656.136	177,8	56%	3'127.322	167,9	56%	270.412
Kp018	1'381.179	148,3	56%	2'262.986	121,5	56%	367.722
Kp019	1'408.745	151,3	56%	2'629.590	141,2	56%	198.100
Kp021	824.194	88,5	55%	1'586.628	146,8	55%	225.113
Kp022	1'469.386	157,8	57%	2'733.198	150,6	57%	233.700
Kp023	1'490.992	160,1	56%	2'804.622	170,7	56%	563.079
Kp024	1'706.351	183,2	57%	3'178.906	217,2	57%	193.163
Kp025	2'151.994	231,1	56%	4'045.254	162,3	56%	367.392
Kp026	1'627.912	174,8	57%	1'511.763	176,5	57%	304.557
Kp027	1'754.947	188,5	56%	1'643.461	139,7	56%	448.457
Kp029	1'124.959	120,8	56%	1'049.111	118,7	56%	175.882
Kp030	1'184.095	127,2	57%	1'105.332	105,4	56%	49.842
Kp031	1'050.656	113	56%	981.461	105	56%	343.415
Kp032	1'056.050	113	56%	977.788	68,2	56%	228.995
Kp033	667.316	72	57%	634.913	68,2	57%	225.324
Kp034	644.128	69	57%	611.344	65,7	57%	313.979
Kp035	793.111	85	57%	756.690	81,3	57%	278.175
Kp036	577.409	62	57%	551.112	59,2	57%	313.979
Kp037	372.868	40	56%	353.429	38	56%	304.754
Kp038	597.363	64	57%	570.714	61,3	57%	198.564
Kp039	425.980	46	56%	406.059	43,6	56%	217.910
Kp040	588.248	63	57%	557.410	59,9	57%	186.032
Kp 041	517.115	55,5	57%	493.597	53	57%	193.164

8.3 Identificación de elementos genómicos asociados a resistencia

De acuerdo a los resultados de anotación obtenidos mediante el *software* Prokka, en los 37 genomas de *K. pneumoniae* analizados fueron identificados 86 genes asociados con resistencia a diferentes familias de antibióticos (Tabla 5), de los cuales 23 actúan a través del mecanismo inactivación enzimática, 43 por eflujo de antibióticos, 2 mediante reducción de permeabilidad de antibiótico, 15 a través de alteración de la diana del antibiótico y 2 por protección antibiótica. Además, se observó un gen (*marA*) que actúa mediante dos mecanismos de resistencia: eflujo de antibióticos y reducción de la permeabilidad a los antibióticos.

Tabla 5. Resistoma obtenido mediante el software Prokka para los aislamientos de *K. pneumoniae* analizados

Gen	Familia de Genes	Produce resistencia a	Mecanismo de resistencia
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>KpnG</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico macrólido; antibiótico de fluoroquinolona; antibiótico aminoglucósido; carbapenem; cefalosporina; penam; antibiótico peptídico; penem	Eflujo de antibiótico
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>KpnH</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico macrólido; antibiótico de fluoroquinolona; antibiótico aminoglucósidos; carbapenem; cefalosporina; penam; antibiótico peptídico; penem	Eflujo de antibiótico
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>OmpK37</i>	Porina bacteriana general con permeabilidad reducida a betalactámicos	monobactámico; carbapenem; cefalosporina; cefamicina; penam; penem	Reducción de la permeabilidad a los antibióticos.

Gen	Familia de Genes	Produce resistencia a	Mecanismo de resistencia
<i>KPC-2</i>	<i>KPC</i> betalactamasa	monobactámico; carbapenem; cefalosporina; penam	Inactivación de antibióticos
<i>KPC-3</i>	<i>KPC</i> betalactamasa	monobactámico; carbapenem; cefalosporina; penam	Inactivación de antibióticos
<i>LptD</i>	Bomba de expulsión de antibióticos con casete de unión a ATP (ABC)	Carbapenémicos, rifamicina, aminocumarinas y antibióticos peptídicos.	Eflujo de antibiótico
<i>marA</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND); Porina bacteriana general con permeabilidad reducida a betalactámicos	antibiótico de fluoroquinolona; monobactámico; carbapenem; cefalosporina; gliciliciclina; cefamicina; penam; antibiótico de tetraciclina; antibiótico rifamicina; antibiótico fenicol; triclosán; penem	Eflujo de antibiótico; Reducción de la permeabilidad a los antibióticos.
<i>OmpA</i>	Porina bacteriana general con permeabilidad reducida a betalactámicos	monobactámico; carbapenem; cefalosporina; cefamicina; penam; penem	Reducción de la permeabilidad a los antibióticos.
<i>SHV-1</i>	betalactamasa SHV	carbapenem; cefalosporina; penam	Inactivación de antibióticos
<i>SHV-11</i>	betalactamasa SHV	carbapenem; cefalosporina; penam	Inactivación de antibióticos
<i>SHV-28</i>	betalactamasa SHV	carbapenem; cefalosporina; penam	Inactivación de antibióticos
<i>SHV-60</i>	betalactamasa SHV	carbapenem; cefalosporina; penam	Inactivación de antibióticos
<i>TolC</i>	Bomba de expulsión de antibióticos con casete de unión a ATP (ABC)	antibiótico macrólido; antibiótico de fluoroquinolona; antibiótico aminoglucósidos; carbapenem; cefalosporina; gliciliciclina; cefamicina; penam; antibiótico de tetraciclina; antibiótico peptídico; antibiótico aminocumarina; antibiótico rifamicina; antibiótico fenicol; triclosán; penem	Eflujo de antibiótico

Gen	Familia de Genes	Produce resistencia a	Mecanismo de resistencia
<i>ampH beta-lactamase</i>	betalactamasa tipo ampC	cefalosporina; penam	Inactivación de antibióticos
<i>PBP3</i>	Mutaciones en la proteína de unión a penicilina que confieren resistencia a los antibióticos betalactámicos	cefalosporina; cefamicina; penam	Alteración de la diana del antibiótico
<i>AAC(3)-Ile</i>	CAA(3)	antibiótico aminoglucósido	Inactivación de antibióticos
<i>AAC(6')-Ib-cr</i>	CAA(6')	antibiótico de fluoroquinolona; antibiótico aminoglucósido	Inactivación de antibióticos
<i>AAC(6')-Iz</i>	CAA(6')	aminoglucosidos	Inactivación de antibióticos
<i>aadA2</i>	ANT(3'')	antibiótico aminoglucósido	Inactivación de antibióticos
<i>acrB</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico de fluoroquinolona; cefalosporina; gliciliciclina; penam; antibiótico de tetraciclina; antibiótico rifamicina; antibiótico fenicol; triclosán	Eflujo de antibiótico
<i>acrD</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico aminoglucósidos	Eflujo de antibiótico
<i>AcrE</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico de fluoroquinolona; cefalosporina; cefamicina; penam	Eflujo de antibiótico
<i>AcrF</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico de fluoroquinolona; cefalosporina; cefamicina; penam	Eflujo de antibiótico
<i>AcrS</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico de fluoroquinolona; cefalosporina; gliciliciclina; cefamicina; penam; antibiótico de tetraciclina; antibiótico rifamicina; antibiótico fenicol; triclosán	Eflujo de antibiótico
<i>adeF</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico de fluoroquinolona; antibiótico de tetraciclina	Eflujo de antibiótico
<i>APH(3'')-Ib</i>	HAP(3'')	antibiótico aminoglucósido	Inactivación de antibióticos

Gen	Familia de Genes	Produce resistencia a	Mecanismo de resistencia
<i>APH(6)-Id</i>	HAP(6)	antibiótico aminoglucósido	Inactivación de antibióticos
<i>ArnT</i>	pmr fosfoetanolamina transferasa	antibiótico peptídico	Alteración de la diana del antibiótico
<i>arr-3</i>	rifampicina ADP-ribosiltransferasa (Arr)	antibiótico rifamicina	Inactivación de antibióticos
<i>bacA</i>	Proteínas relacionadas con el pirofosfato de undecaprenilo	antibiótico peptídico	Alteración de la diana del antibiótico
<i>baeR</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico aminoglucósido; antibiótico aminocumarina	Eflujo de antibiótico
<i>baeS</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico aminoglucósidos; antibiótico aminocumarina	Eflujo de antibiótico
<i>catB3</i>	cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)	antibiótico fenicol	Inactivación de antibióticos
<i>catI</i>	cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)	antibiótico fenicol	Inactivación de antibióticos
<i>cpxA</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico aminoglucósidos; antibiótico aminocumarina	Eflujo de antibiótico
<i>CRP</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico macrólido; antibiótico de fluoroquinolona; penam	Eflujo de antibiótico
<i>CTX-M-15</i>	CTX-M betalactamasa	cefalosporina	Inactivación de antibióticos
<i>dfrA12</i>	dihidrofolato reductasa resistente a la trimetoprima dfr	antibiótico de diaminopirimidina	Reemplazo de diana de antibiótico
<i>dfrA14</i>	dihidrofolato reductasa resistente a la trimetoprima dfr	antibiótico de diaminopirimidina	Reemplazo de diana de antibiótico
<i>emrA</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico de fluoroquinolona	Eflujo de antibiótico
<i>emrB</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico de fluoroquinolona	Eflujo de antibiótico
<i>emrR</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico de fluoroquinolona	Eflujo de antibiótico
<i>emrY</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico de tetraciclina	Eflujo de antibiótico

Gen	Familia de Genes	Produce resistencia a	Mecanismo de resistencia
<i>eptA</i>	pmr fosfoetanolamina transferasa	antibiótico peptídico	Alteración de la diana del antibiótico
<i>eptB</i>	pmr fosfoetanolamina transferasa	antibiótico peptídico	Alteración de la diana del antibiótico
<i>Escherichia coli EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin</i>	EF-Tu resistente a elfamicina	antibiótico elfamicina	Alteración de la diana del antibiótico
<i>Escherichia coli gyrA conferring resistance to fluoroquinolones</i>	gyrA resistente a las fluoroquinolonas	antibiótico de fluoroquinolona	Alteración de la diana del antibiótico
<i>Escherichia coli parC conferring resistance to fluoroquinolones</i>	parC resistente a las fluoroquinolonas	antibiótico de fluoroquinolona	Alteración de la diana del antibiótico
<i>Escherichia coli UhpT with mutation conferring resistance to fosfomicin</i>	UhpT resistente a los antibióticos	fosfomicina	Alteración de la diana del antibiótico
<i>evgA</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico macrólido; antibiótico de fluoroquinolona; penam; antibiótico de tetraciclina	Eflujo de antibiótico
<i>evgS</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico macrólido; antibiótico de fluoroquinolona; penam; antibiótico de tetraciclina	Eflujo de antibiótico
<i>FosA5</i>	fosfomicina tiol transferasa	fosfomicina	Inactivación de antibióticos
<i>FosA6</i>	fosfomicina tiol transferasa	fosfomicina	Inactivación de antibióticos
<i>gadX</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico macrólido; antibiótico de fluoroquinolona; penam	Eflujo de antibiótico
<i>H-NS</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico macrólido; antibiótico de fluoroquinolona; cefalosporina; cefamicina; penam; antibiótico de tetraciclina	Eflujo de antibiótico

Gen	Familia de Genes	Produce resistencia a	Mecanismo de resistencia
<i>kdpE</i>	kdpDE	antibiótico aminoglucósidos	Eflujo de antibiótico
<i>Klebsiella pneumoniae KpnE</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico macrólido; antibiótico aminoglucósido; cefalosporina; antibiótico de tetraciclina; antibiótico peptídico; antibiótico rifamicina	Eflujo de antibiótico
<i>Klebsiella pneumoniae KpnF</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico macrólido; antibiótico aminoglucósidos; cefalosporina; antibiótico de tetraciclina; antibiótico peptídico; antibiótico rifamicina	Eflujo de antibiótico
<i>Klebsiella pneumoniae ramR mutants</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico de fluoroquinolona; cefalosporina; glicilciclina; penam; antibiótico de tetraciclina; antibiótico rifamicina; antibiótico fenicol; triclosán	Eflujo de antibiótico
LEN-17	LEN betalactamasa	penam; penem	Inactivación de antibióticos
<i>mdtA</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico aminocumarina	Eflujo de antibiótico
<i>mdtB</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico aminocumarina	Eflujo de antibiótico
<i>mdtC</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico aminocumarina	Eflujo de antibiótico
<i>mdtG</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	fosfomicina	Eflujo de antibiótico
<i>mdtH</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico de fluoroquinolona	Eflujo de antibiótico
<i>mdtN</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico nucleósido; tinte de acridina	Eflujo de antibiótico
<i>mdtO</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico nucleósido; tinte de acridina	Eflujo de antibiótico
<i>mdtP</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico nucleósido; tinte de acridina	Eflujo de antibiótico
<i>mphA</i>	macrólido fosfotransferasa (MPH)	antibiótico macrólido	Inactivación de antibióticos

Gen	Familia de Genes	Produce resistencia a	Mecanismo de resistencia
<i>msbA</i>	Bomba de expulsión de antibióticos con casete de unión a ATP (ABC)	antibiótico nitroimidazol	Eflujo de antibiótico
<i>oqxA</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico de fluoroquinolona; glicilciclina; antibiótico de tetraciclina; antibiótico de diaminopirimidina; antibiótico nitrofurano	Eflujo de antibiótico
<i>oqxB</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico de fluoroquinolona; glicilciclina; antibiótico de tetraciclina; antibiótico de diaminopirimidina; antibiótico nitrofurano	Eflujo de antibiótico
<i>OXA-1</i>	OXA betalactamasa	cefalosporina; penam	Inactivación de antibióticos
<i>PmrF</i>	pmr fosfoetanolamina transferasa	antibiótico peptídico	Alteración de la diana del antibiótico
<i>qacEdelta1</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	agentes desinfectantes y antisépticos	Eflujo de antibiótico
<i>QnrB1</i>	proteína de resistencia a quinolonas (qnr)	antibiótico de fluoroquinolona	Protección antibiótica
<i>QnrB19</i>	proteína de resistencia a quinolonas (qnr)	antibiótico de fluoroquinolona	Protección antibiótica
<i>rsmA</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico de fluoroquinolona; antibiótico de diaminopirimidina; antibiótico fenicol	Eflujo de antibiótico
<i>smeR</i>	bomba de Eflujo de antibiótico de división celular de nodulación de resistencia (RND)	antibiótico aminoglucósidos; cefalosporina; cefamicina; penam	Eflujo de antibiótico
<i>sul1</i>	Sul resistente a las sulfonamidas	antibiótico de sulfonamida	Reemplazo de diana de antibiótico
<i>sul2</i>	Sul resistente a las sulfonamidas	antibiótico de sulfonamida	Reemplazo de diana de antibiótico
<i>TEM-1</i>	TEM betalactamasa	monobactámico; cefalosporina; penam; penem	Inactivación de antibióticos
<i>tet(A)</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico de tetraciclina	Eflujo de antibiótico

Gen	Familia de Genes	Produce resistencia a	Mecanismo de resistencia
<i>tet(D)</i>	bomba de expulsión de antibióticos de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	antibiótico de tetraciclina	Eflujo de antibiótico
<i>ugd</i>	pmr fosfoetanolamina transferasa	antibiótico peptídico	Alteración de la diana del antibiótico
<i>YojI</i>	Bomba de expulsión de antibióticos con casete de unión a ATP (ABC)	antibiótico peptídico	Eflujo de antibiótico

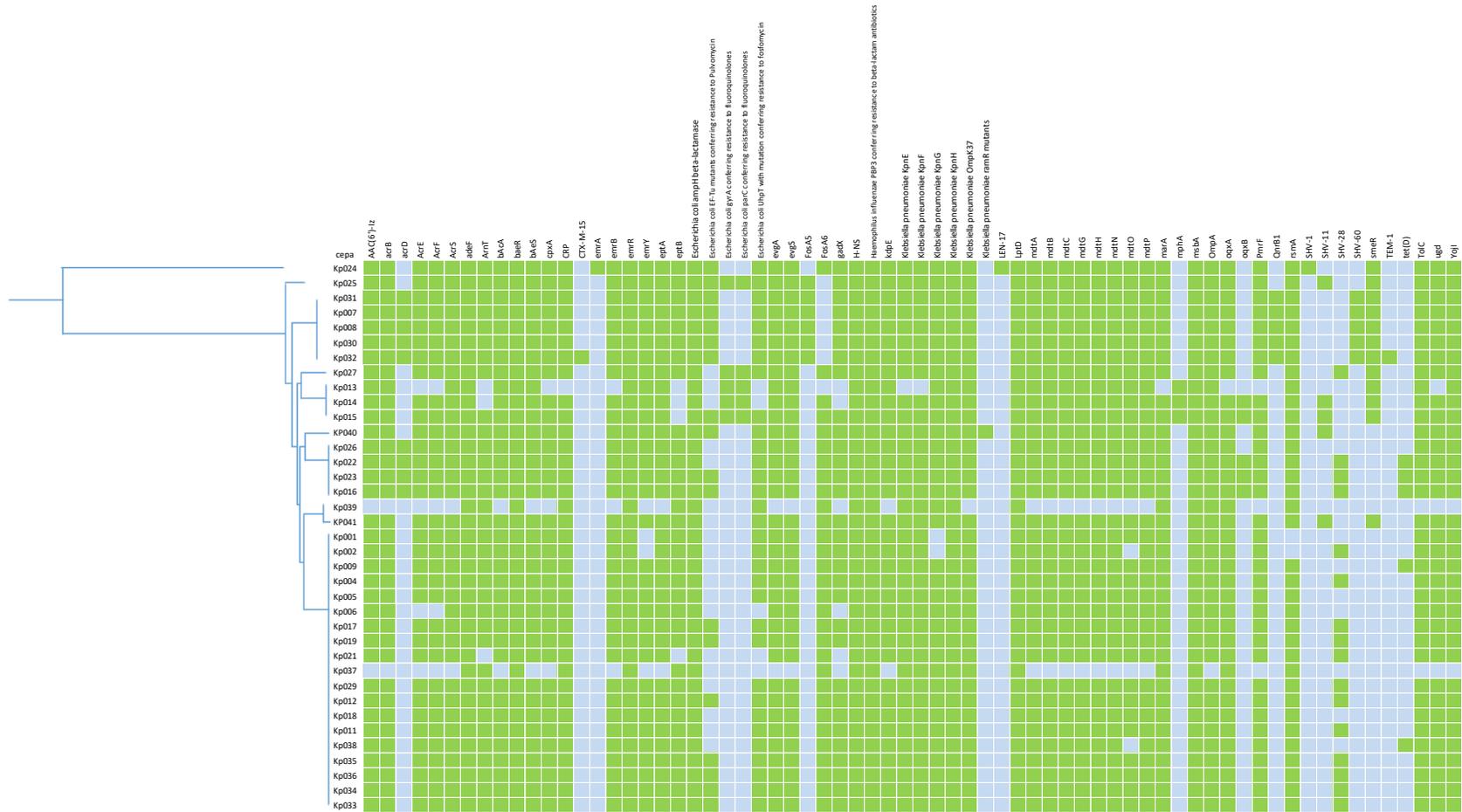
La caracterización del resistoma mostró una alta proporción de genes a nivel cromosómico que codifican para distintas betalactamasas (Figura 9). Se observó la presencia del complejo eflujo *AcrAB-ToIC*, representante arquetípico de la familia de resistencia-nodulación-división celular (RND), uno de los grupos más importantes de bombas de eflujo de múltiples fármacos en *K. pneumoniae* y otras bacterias (Ying Li *et al.*, 2022). De hecho, la mayoría de los aislamientos (94,59%) presentaron al menos un tipo del gen *AcrB* en combinación con *ToIC*.

Los genes *H-NS*, *KpnE*, *KpnF*, *KpnG* y *KpnH*, *LptD*, *marA* y *OmpA* estuvieron en más del 95% de los aislamientos y hacen parte de su capacidad de resistencia natural o intrínseca a los antimicrobianos. Se destaca la presencia del gen *Ompk37* en el 97% de los aislamientos analizados, relacionado con la pérdida o modificación de porinas, mecanismo que conlleva a la disminución de permeabilidad de la membrana externa bacteriana y por ende incrementa la resistencia a diferentes antimicrobianos como monobactámicos (aztreonam); carbapenemes (ertapenem, imipenem, meropenem) y cefalosporinas (ceftiazidima, ceftriazona, cefoxitima, cefepima), lo cual coincidió con el fenotipo de resistencia de los aislamientos en estudio.

Los genes del tipo *SHV* han sido los más frecuentemente identificados en aislamientos de *K. pneumoniae* en las últimas décadas (Chaves *et al.*, 2001). Típicamente esta enterobacteria posee a nivel cromosómico el gen *SHV-1*, el cual le confiere resistencia natural a penicilinas y cefalosporinas de primera generación. Este gen estuvo presente en un solo aislamiento, mientras que la variante *SHV-28* fue la más frecuente hallándose en el 43% de los aislamientos, la cual tiene un espectro de resistencia más amplio ya que confiere resistencia a cefalosporinas y carbapenémicos (López., *et al.*, 2015). En Colombia, la caracterización de la familia de enzimas *SHV* a partir de aislamientos de *K. pneumoniae*

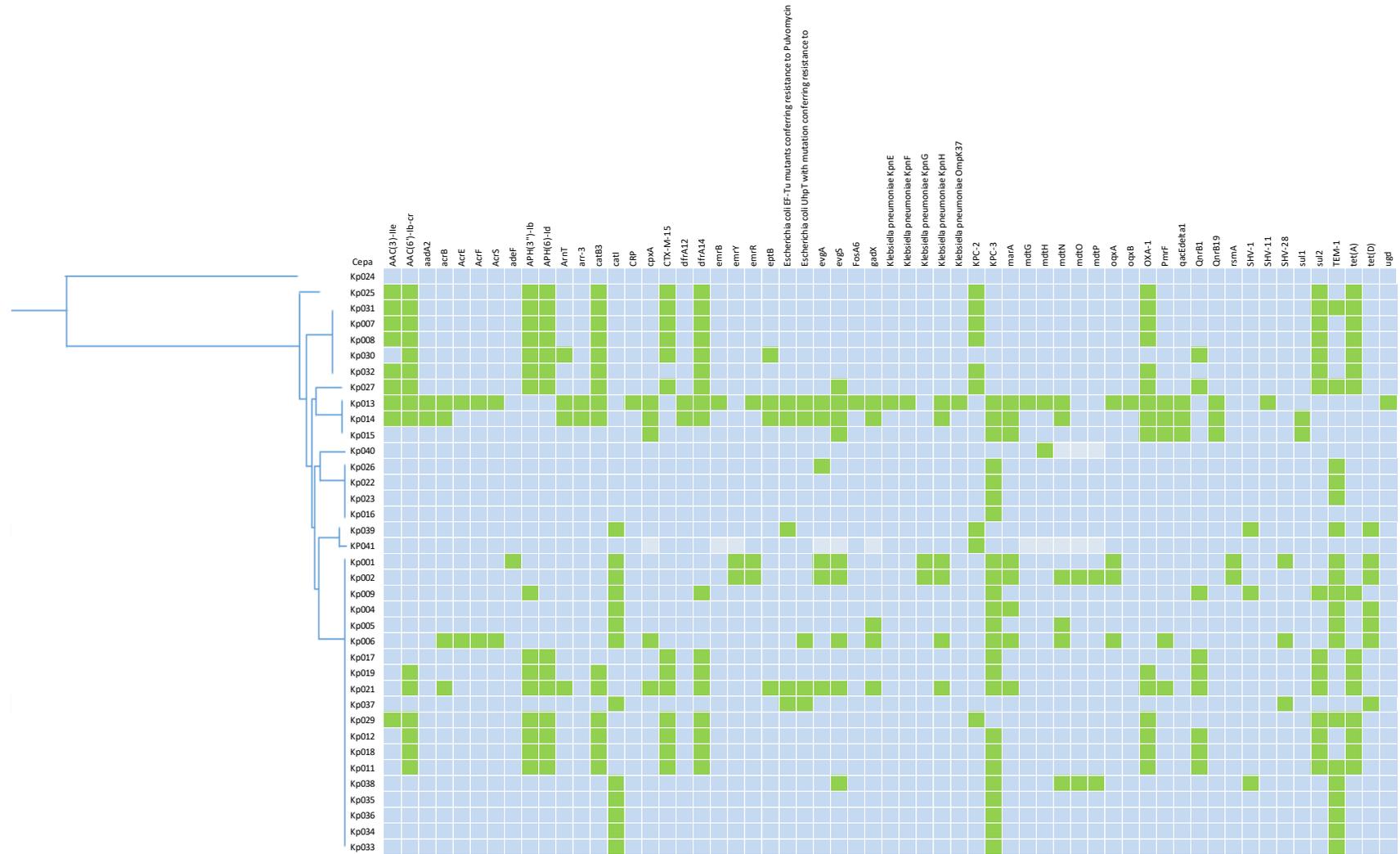
realizada en el año 2001 mostró que la SHV-5 fue la betalactamasa más frecuente con una posible diseminación por transferencia horizontal de plásmidos de conjugación. Así mismo, Rojas *et al.* (2018) en un estudio retrospectivo, encontraron que esta betalactamasa se ha mantenido presente en el país con frecuencias variables, pero mutando constantemente (SHV-5/11/12/25/27/31/33/101/108/129) desde el año 2002. Otros estudios desarrollados en distintas ciudades han reportado la presencia de SHV-5/2/12/26/27 (Rada *et al.*, 2019) y SHV-28 (Villa *et al.*, 2017).

Figura 9. Genes cromosómicos relacionados con resistencia a antibióticos para los aislamientos de *K. pneumoniae* obtenidos mediante RGI a partir de los datos de anotación.



Las casillas marcadas con color verde significan presencia del gen.

Figura 10. Genes plasmídicos relacionados con resistencia a antibióticos de los aislamientos de *K. pneumoniae* obtenidos mediante RGI a partir de los datos de anotación.



Entre los genes plasmídicos más importantes que codifican para betalactamasas (Figura 10) se encontraron *TEM-1* (51%) que confiere resistencia a penicilina y cefalosporinas de primera generación como cefatolina, considerado uno de los tipos de BLEE descrito con mayor frecuencia en Gram negativos y considerado uno de los más dominantes en varios países. *OXA-1* (41%) capaz de degradar oxacilina, *CTX-M-15* (35%) capaz de degradar cefotaxima, ceftixidima, ceftriazona, cefepime y tazobactam, y dos del tipo *KPC* (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*): *KPC2* (24,3%) y *KPC3* (64,9%), caracterizados por su capacidad de hidrolizar carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y aztreonam. Ningún aislamiento co-expresó las dos variantes alélicas del gen *KPC*.

La diseminación de los genes *KPC* ha sido progresiva a nivel mundial posterior a su descripción en Carolina del Norte, Estados Unidos (Nordmann, 2014); en Latinoamérica, se ha encontrado en Brasil, Argentina, Venezuela y Colombia, en donde el primer caso de *K. pneumoniae KPC*, portador del gen *KPC-2* se detectó en el año 2005 en la ciudad de Medellín (Montúfar-Andrade *et al.*, 2016), fecha desde la que la resistencia mediada por *KPC* se ha diseminado a varias especies de enterobacterias en múltiples hospitales del país debido principalmente a su ubicación en plásmidos auto transferibles o móviles, complicando la terapia de las infecciones causadas por estas bacterias (Rojas *et al.*, 2017). En el año 2008 se presentó un brote en el Hospital Pablo Tobón, también en la ciudad de Medellín, a causa de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, donde se determinó que las aislamientos aisladas eran portadoras del gen *KPC-3* (Montúfar-Andrade *et al.*, 2016), el cual fue introducido aparentemente desde Israel; sin embargo, el estudio realizado por Rojas *et al.* (2018) deja entrever que para el año 2007 las cepas de *K. pneumoniae* portadoras de *KPC-3* ya circulaban en el país sin ser detectadas y actualmente la presencia de cepas de *KPC* se ha convertido en un problema endémico en el país (Pacheco *et al.*, 2014; Vera-Leiva, *et al.*, 2017), lo cual es reforzado por el INS que reportó que en Colombia el 66% de las enterobacterias resistentes a carbapenémicos expresan *KPC* (Instituto Nacional de Salud, 2018).

Dentro de las familias más descritas como mediadores de resistencia a aminoglucósidos a nivel plasmídico fueron anotados los genes *AAC(6')Ib-cr* para el 40,54% de los aislamientos y *AAC(3')-Ile* en el 24,32% de ellos, que se caracterizan por transmitirse mediante plásmidos denominados R, con capacidad de producir enzimas modificantes de

la membrana celular como acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas y fosofototransferasas. Además se identificaron los genes *APH(3')-Ib* en 41% de los aislamientos y *APH(6')-Id* en el 38%, lo que concuerda con que en Colombia en un estudio retrospectivo de aislamientos de *K. pneumoniae* se reportó la presencia de genes de las familias ACC y APH desde el año 2002 y su rápida diseminación a partir del año 2009 en adelante (Rojas *et al.*, 2018).

En cuanto a genes asociados a resistencia a fluoroquinolonas, los genes circulantes en plásmidos fueron *AAC(6')-Ib-cr* (41%), *emrR* (8,1%), *evgA* (16%), *evgS* (24%), *gadX* (14%) y *QnrB19* (8,1%). Los genes de la familia QNR han sido los más circulantes en el país, mientras que *AAC(6')-Ib-cr* ha sido el menos frecuente (Rojas *et al.*, 2018). La presencia de estos genes en los aislamientos analizados evidencia los niveles intermedios y bajos para la resistencia a fluoroquinolonas evaluadas que fue de 54% para ciprofloxacina y 5,41% para norfloxacina, expresada en su gran mayoría mediante el mecanismo de resistencia bombas de flujo (59,45%) que operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas (Tafur *et al.*, 2008).

La resistencia en enterobacterias a las quinolonas se alcanza por acumulación de mutaciones en los genes, fundamentalmente en *gyrA* y *parC*, genes que codifican girasa y topoisomerasa respectivamente (Calvo *et al.*, 2011). En la presente investigación se encontraron en 14% *gyrA* y 14% *parC*. Aunque no se conocen reportes recientes en Colombia, el mismo autor manifiesta que su aparición no se debe desestimar ya que el nivel de resistencia es variable dependiendo de la diana afectada y del número de mutaciones acumuladas, una sola mutación en *gyrA* es suficiente para provocar resistencia y una disminución de la sensibilidad a las fluoroquinolonas.

Los aislamientos catalogados como MDR (19 aislamientos), presentaron en general un patrón de genes asociados a resistencia a diferentes familias de antibióticos, entre los cuales se destacan *AAC* (63,15%), *APH* (57,89%), *CTX-M-15* (57,89%), *dfp* (68,42%), *KPC* (84,21%), *OXA-1* (63,15%), *qnr* (57,89%), *TEM-1* (31,57%), *tet* (63,15%), *sul* (68,42%) y *catB3* (63,15%), resultados similares a los reportados previamente en cepas colombianas de *K. pneumoniae* (Villa *et al.*, 2017; Rojas *et al.*, 2018).

En general al analizar los mecanismos de resistencia asociados a los genes encontrados en los aislamientos estudiados, el más frecuente fue el de las bombas de eflujo antibiótico

(59,32%), seguido de inactivación de antibióticos (28,81%), reducción de permeabilidad (5,08%) y alteración de la diana del antibiótico (5,08%) lo cual según lo describen Rojas (2018) y Merchán (2021) son comportamientos normales de enterobacterias como *K.pneumoniae*, además resaltan que el mecanismo de resistencia mas común y propio de los microorganismo de esta familia son las bombas de eflujo las cuales pueden ser consideradas como parte de los mecanismos de la resistencia natural o intrínseca de este tipo de microorganismos

8.4 Tipificación de los Aislamientos

El árbol filogenético de los aislamientos de *K. pneumoniae* (Figura 10) y los secuenciotipos (ST) fueron obtenidos a partir de los datos del genoma completo y mediante la evaluación de polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs los cuales se alinearon e identificaron haciendo uso del programa Snippy-core, que a su vez fueron utilizados para generar un árbol filogenético basado en el algoritmo de máxima verosimilitud con un modelo de sustitución de nucleótidos mediante el uso del programa RAxML, el árbol de máxima verosimilitud se visualizó mediante la herramienta Web iTOL v6, finalmente los secuenciotipos fueron identificados haciendo uso de la base de datos PubMLST, lo cual permitió identificar las variantes de cada aislamiento de estudio, así como determinar y agrupar cada una de estas según su variación de SNPs utilizando como genoma de referencia HNS11286, proceso realizado por el equipo de bioinformática del grupo de investigación.

Fueron identificados nueve (9) secuenciotipos como resultado de la tipificación por MLST, siendo el más predominante el ST1082 (48,64%), seguido por ST236 (10,81%), ST14 (10,81%), ST11(8,10%), ST244 (5,40%,) y los secuenciotipos ST23, ST307, ST392 y ST1583 (2,70% c/u). Cabe resaltar que los aislamientos Kp032 y Kp033, presentaron una variación alélica no documentada en las bases de datos actualmente, por lo que pueden ser considerados como ST nuevos.

En Colombia se han identificado diferentes ST asociados a la diseminación de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas, principalmente ST258, ST11, ST307, ST14 y ST15 (Ocampo *et al.*, 2016), los cuales han sido reportados en varias ciudades como Medellín (Rojas *et al.*, 2018), Manizales (Garcia-Fulgueiras *et al.*, 2020)(Garcia-Fulgueiras *et al.*, 2020)(Garcia-Fulgueiras *et al.*, 2020)(Garcia-

Fulgueiras et al., 2020)(Garcia-Fulgueiras et al., 2020) y Bogotá (Alvarez et al., 2006; Leal et al., 2006; Rodríguez et al., 2014; Saavedra et al., n.d.), todos asociados con la presencia del gen *KPC-3*. En Suramérica, se han identificado ST asociados a la presencia de cepas *KPC*, principalmente de ST258, ST11, ST14, ST147, ST307, entre otros pertenecientes a linajes resistentes a la gran mayoría de antimicrobianos (Vera-Leiva et al., n.d.; Falco et al., 2017; Yauri et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, el ST1082 fue el más frecuente en los aislamientos analizados, contrastando con lo reportado por Quintero y Varón (2022) y (Victoria et al., n.d.), quienes en un estudio realizado en dos hospitales de Colombia, encontraron únicamente dos aislamientos pertenecientes a dicho linaje. De acuerdo con el Instituto Pasteur, el ST1082 se caracteriza por la presencia de genes *KPC* y/o la producción de carbapenemasas (INSTITUT PASTEUR, último acceso noviembre de 2022)(INSTITUT PASTEUR, último acceso noviembre de 2022). Lo anterior se ratifica en este estudio ya que el 100% los aislamientos pertenecientes al ST1082 portaban los genes *kpnG*, *kpnH*, *Ompk37*, *LptD*, *OmpA*, *TolC*, *KPC* y el 89,5% portaban alguna variante del gen SHV, genes asociados a resistencia a carbapenémicos.

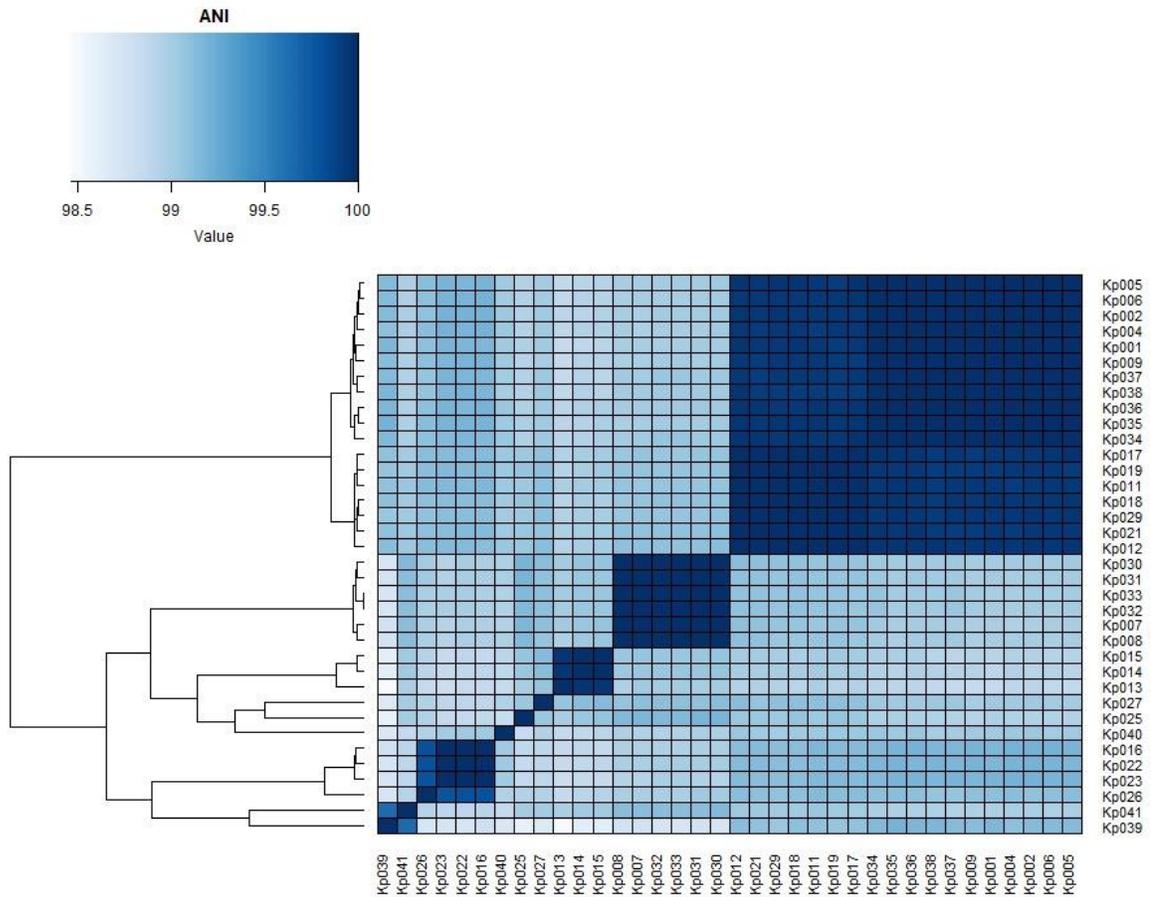
Dentro de las características de resistencia a antibióticos reportados en el antibiograma, de los aislamientos ST1082 se determinó que el 100% fueron resistentes a aztreonam, ceftacidima, ceftriaxona, cefuroxima, cefazolina, cefepima, imipenem, meropenem, ampicilina sulbactam, piperacilina tazobactam, ertapenem, ceftolozano tazobactam y tetraciclina, correlacionándose con los genes presentes en estos aislamientos asociados a resistencia a diferentes familias de antibióticos, tales como *AAC(6')-Ib-cr* (33%), *APH(3')-Ib* (5,6%), *APH(6')-Id* (44%), *CTX-M-15* (39%), *KPC-3* (5,6%), *KPC-2* (5,6%), *OXA-1* (33%), *TEM-1* (67%), *SHV-28* (72,2%) *evgA* (17%), *evgS* (28%), *QnrB1* (39%) y *dfrA14* (44%).

Según el árbol filogenético (figur xxx), los aislamientos fueron agrupados de tal forma que cuatro (4) *clados* incluyeron 31 de los 37 aislamientos, indicando una baja diversidad clonal. El clado1 estaba constituido por tres (3) aislamientos ST11, el clado 2 incluía cuatro (4) aislamientos ST14, el clado 3 conformado por cinco (5) aislamientos ST236, excepto uno de ellos (kp032) cuyo ST hasta el momento no ha sido reportado en las bases de

datos, y finalmente el *clado* 4 conformado por 19 aislamientos ST1082, excepto kp033 cuyo ST hasta ahora no ha sido reportado en las bases de datos. El hecho de que se agrupen aislamientos correspondientes a nuevos STs junto STs indetificados en la base de datos, como en el caso de los *clados* 3 y 4, muestra claramente el poder de resolución de la secuenciación de genoma completo para el seguimiento epidemiológico de precisión encontrado aunque dos aislamientos tengan dos STs diferentes, pueden estar relacionados clonalmente.

De acuerdo al algoritmo ANI (Anexo 6), que representa la identidad de nucleótidos promedio de todos los genes ortólogos compartidos entre dos genomas cualesquiera y ofrece una resolución robusta entre aislamientos de la misma especie o especies estrechamente relacionadas es decir, mostrando 80 – 100% de ANI (Jain *et al.*, 2018), el grado de similitud entre secuencias de los aislamientos incluidos en el *clúster* 4, hace que puedan ser considerados como clones, ya que se encontraron valores de similitud entre secuencias de 98,99 a 99,99% (Figura 11) , lo que se relaciona ampliamente con los resultados arrojados por el análisis de SNPs, que dio como resultado valores de menos a 50 SNPs de diferencia entre los genomas de los aislamientos pertenecientes a estos *clados*.

Figura 11. Identidad de nucleótidos promedio (ANI) para los aislamientos de *K. pneumoniae* analizados



(Alvarez et al., 2006; Leal et al., 2006; Rodríguez et al., 2014; Saavedra et al., n.d.)

Los aislamientos se realizaron en un periodo de once meses comprendido entre diciembre de 2019 hasta diciembre de 2020 (Figura 12). En los meses de febrero y abril de 2020 se presentó el mayor número de aislamientos ST1082. El 50% de estos se obtuvieron de pacientes en UCI, el 38% en hospitalización y 12% en UCIN. El 38,8% provenían de hemocultivos, lo cual indica que la infección más asociada al ST1082 en este estudio fue bacteremia.

El ST1082 a pesar de ausentarse en algunos períodos de estudio se mantuvo constante de inicio a fin (Figura 12). El primer aislamiento (17 de diciembre de 2019) de este ST se hizo en kp001 y kp002, provenientes de un mismo paciente. Según los valores de ANI estos dos aislamientos se asemejaban en 99,99% (Anexo 6), por lo que se pueden considerar altamente similares correspondiendo a clones de la misma bacteria con leves diferencias en su resistoma. Dentro de los genes más representativos en estos dos aislamientos están *KPC-3*, *TEM-1* y los de la familia *tet*, los cuales para el *clado* 4 estuvieron presentes en los diferentes aislamientos de ST1082 en el período de estudio, representando los mayores porcentajes así: *KPC-3* (88,88%), *tet* (77,77%), *TEM-1* (66,66%).

Como se puede observar en el resistoma de plásmidos (Figura 10) contrastado con la línea de tiempo (Figura 12), las variaciones genómicas de estos aislamientos se pueden dividir en tres patrones, el primero comprendido por aislamientos obtenidos en el período de diciembre de 2019 a febrero de 2020 donde la carga de genes que conceden resistencia a antibióticos es baja, el segundo patrón se concentra entre marzo a julio del año 2020 y es el más diverso en cuanto a genes en el resistoma de plásmidos, ya que además de los genes presentes en el primer patrón, se detectaron los genes de la familia *APH* (confieren resistencia a aminoglucósidos), *CTX-M-15* y *OXA-1* (confieren resistencia a betalactámicos), *qnrB* (confieren resistencia a fluoroquinolonas), *dfrA* y *sul* (confiere resistencia a trimetropim y sulfonamidas), lo que podría indicar una presión selectiva por el uso de los fármacos (Celis y Camacho, 2017). Además en estos meses se presentó el primer pico de la pandemia causada por el virus SarsCov-2, donde las instituciones de salud ampliaron la disponibilidad de camas en cuidados intensivos, intermedios y hospitalización, así como los tratamientos con diferentes antibióticos, ya que se desconocía el tratamiento adecuado para dichas infecciones (Instituto Nacional de Salud,

2022). El tercer patrón se presentó entre septiembre de 2020 a noviembre de 2020 y se asemeja en gran medida al primer patrón, es decir que se observó una menor presencia de genes plasmídicos que confieren resistencia a antibióticos, lo cual posiblemente pueda estar relacionado con una menor presión selectiva por el uso de fármacos ya que para este período los contagios por SarsCov-2 bajaron y los tratamientos para las infecciones eran menos severos.

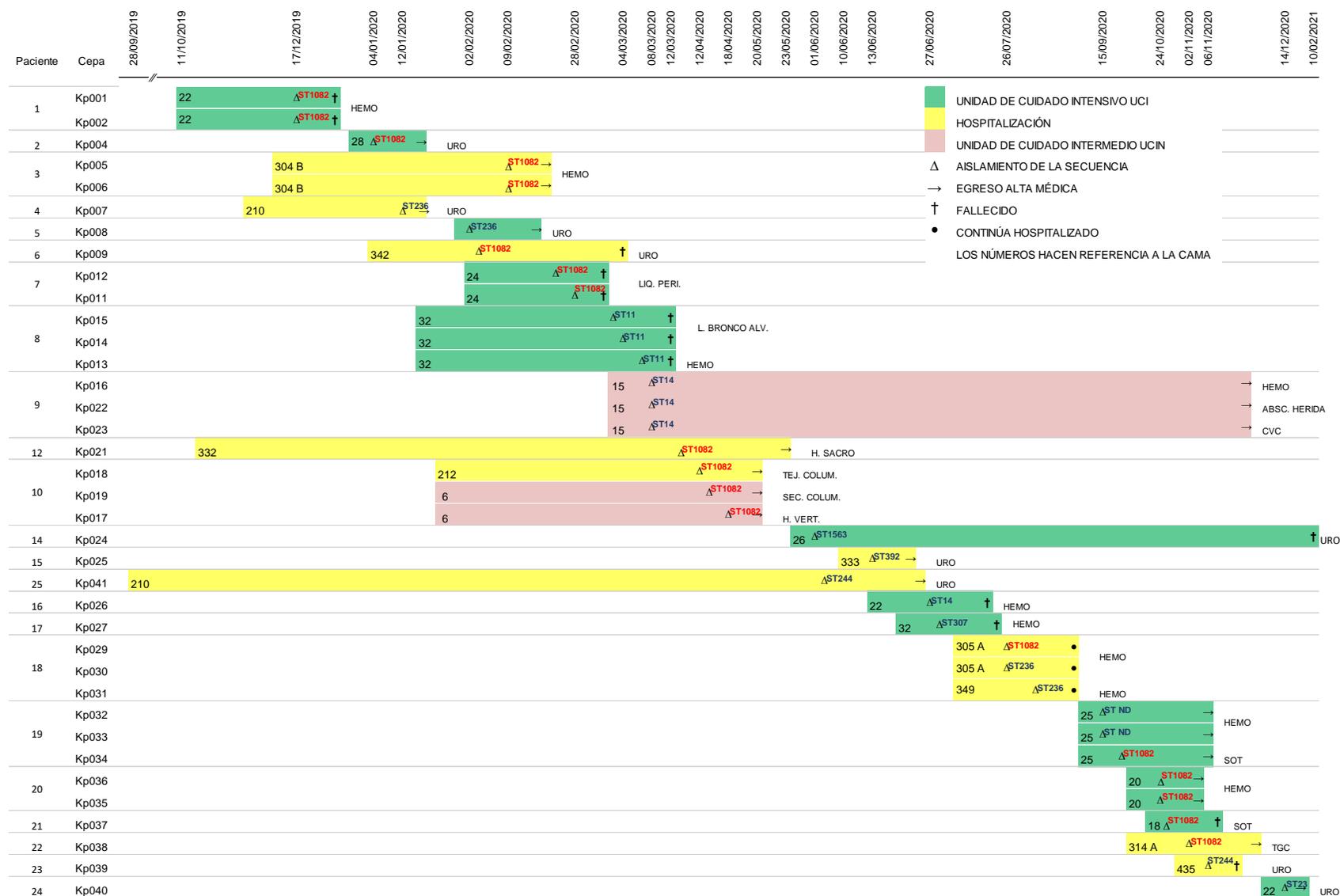
Finalmente, al revisar las estancias de los diferentes pacientes de donde provenían los aislamientos del *clado* 4, se pudo detectar que todos ellos pasaron por el servicio de unidad de cuidados intensivos (UCI) y por diferentes pabellones y servicios del hospital, ya sea por su estado clínico o por la necesidad de la toma de exámenes especializados en diferentes locaciones del mismo, lo cual da indicios de la alta circulación del ST1082 y su permanencia en el tiempo.

Cabe resaltar que en el Hospital Universitario Nacional la enterobacteria *K. pneumoniae* ya había sido aislada previamente a este estudio (Cortés J, (2020); sin embargo, no se había realizado la identificación molecular del microorganismo circulante. Esta investigación permitió evidenciar la presencia de una bacteria de *K. pneumoniae* ST1082 que se disemina en todos los servicios, en todos los tipos de muestras (hemocultivo, líquido peritoneal, entre otros) sin discriminar sitios de infección, colonizando los distintos tejidos u órganos, en los distintos grupos etarios y que se mantiene en el tiempo sin presentar grandes variaciones en su genoma, lo que permite suponer se trata de un ST endémico en la institución y no de un brote por IASS, que según el INS (2022) se puede presentar en alguna de las siguientes situaciones: primero cuando hay un aumento inusitado de casos, segundo cuando aparece un microorganismo que previamente no se había presentado en el servicio o institución de salud o, por último cuando se presenta un nuevo perfil de resistencia.

Lo anterior se corrobora con casos particulares como la presencia de un aislamiento de ST1563 (kp024) procedente de un paciente referido de otro centro hospitalario ubicado en una ciudad diferente a Bogotá, sometido a tratamientos con distintos antimicrobianos sin reportes previos de cultivo ni antibiograma, el cual no comparte genes en su resistoma plasmídico con los otros aislamientos. Así mismo los aislamientos que presentaron los secuenciotipos ST11, ST307, ST23 y ST14 provenientes de pacientes remitidos de otros centros hospitalarios donde ya habían presentado cuadro de infección, secuenciotipos que no prosperaron en el ambiente del HUN como el ST1082 (Figura 12).

Cabe destacar que la institución hospitalaria hace rotación de desinfectantes de acuerdo a protocolos establecidos; en el mes de mayo se hizo la rotación sin que esto significara disminución en la carga bacteriana por *K. pneumoniae*, presentándose además un caso particular con el ST11 asociado al gen *qacEdelta1* el cual está relacionado con resistencia a los desinfectantes.

Finalmente y de acuerdo con la reportado por investigadores en el campo de la vigilancia epidemiológica para la OMS y PAHO como los doctores Rafael Cantón(2023) y Fernando Pasternan (2023) los nuevos clones de *Klebsiella pneumoniae* KPC reportados a nivel de hospitales y centros de salud en América latina pueden ser consideradas super bacterias, ya que se les atribuye una mayor eficiencia para mediar procesos de colonización e infección debido a la acumulación de mutaciones especialmente en genes como *KPC-2* y *KPC-3*, lo cual podría generar con el tiempo la aparición de clones hiper mutantes endémicos en las instituciones hospitalarias, que deben evitarse a toda costa. La variabilidad en los perfiles de resistencia de los aislamientos de estudio así como también la persistencia en tiempo de secuenciotipos considerados de alto riesgo por su capacidad de adquirir fácilmente mecanismos de resistencia asociados a elementos móviles por parte de microorganismos del mismo género y especie, así como también de otros tipos de bacterias como algunas enterobacterias, como por ejemplo el ST1082, alerta a la comunidad médica sobre la necesidad imperiosa de mejorar las estrategias de control epidemiológico por medio de estudios como la presente investigación.

Figura 12. Línea de tiempo de aislamientos de *K. pneumoniae* en el HUN, ST identificados y origen de las muestras

9. Conclusiones

- De los 37 aislamientos de *K. pneumoniae* analizados, 19 revelaron un fenotipo multirresistente (MDR) a las diferentes familias de antibióticos betalactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y trimetropim sulfametiazol.
- Entre los genes plasmídicos más importantes que codifican betalactamasas se encontraron *TEM-1* (51%), *OXA-1* (41%), *CTX-M-15* (35%) y dos del tipo *KPC* *KPC-2* (24,3%) y *KPC-3* (64,9%);
- Entre los genes asociados a resistencia a fluoroquinolonas fueron identificados *AAC(6')-Ib-cr* (33%), *eVgA* (16,6%), *eVgS* (27,7%) y *qnrB1*(44,4%);
- Entre los genes asociados a resistencia para aminoglucósidos fueron identificados *AAC(6')-Ib-cr* (33%), *APH(3')-Ib* (44%) y *APH(6)-Id* (39%) y adicionalmente el gen *dfrA14* (46%) que expresa resistencia a trimetropim.
- En plásmidos fue identificado el gen *qacEdelta1*, que confiere resistencia a desinfectantes, el cual fue aislado en el servicio de UCI proveniente de muestras de hemocultivo y lavado broncoalveolar.
- El mecanismo de resistencia más reportado para los aislamientos estudiados fue bomba de eflujo antibiótico (59,32%), seguido de inactivación de antibióticos (28,81%), reducción de permeabilidad (5,08%) y alteración de la diana del antibiótico (5,08).
- Como resultado de la tipificación por MLST fueron identificados nueve (9) secuenciotipos, siendo el más predominante el ST1082 (48,64%), seguido por ST236 (10,81%), ST14 (10,81%), ST11(8,10%), ST244 (5,40%) y los secuenciotipos ST23, ST307, (2,70%, c/u) considerados como aislamientos intrahospitalarios, mientras el ST392 y ST1563 (2,70%,c/u) reportados como extrahospitalarios. Adicionalmente, se identificaron dos nuevos secuenciotipos.

- De acuerdo el calculo parado del ANI, la diferencias de SNPS y el árbol de máxima verosimilitud, se encontraron 4 clados que indican la diseminación de 4 clones, que se mantuvieron presentes durante el período de estudio y en todos los servicios del hospital.
- Los asilamientos agrupados en el clado 4, en su mayoría ST1082 junto a un ST nuevo, presentaron variaciones en su resistoma indicativas de posible transferencia horizontal de genes.

10. Recomendaciones

- Se recomienda evaluar los genes de virulencia de los aislamientos de *K. pneumoniae* estudiadas con el fin de proveer información filogenética adicional como los mecanismos de virulencia, su prevalencia en determinados pacientes y la dinámica del microorganismo para diseminarse dentro de la institución hospitalaria, lo cual permitirá mejorar el análisis epidemiológico.
- Hacer un estudio de genoma completo para *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas con aislamientos provenientes de distintos centros hospitalarios de Bogotá y del país, que permita evaluar la circulación de genes y secuenciotipos a nivel nacional.
- Hacer uso eficiente de las redes de información microbiológica provistas por el Instituto Nacional de Salud (INS) como el Programa de Vigilancia por Laboratorio de Resistencia Antimicrobiana en Infecciones Asociadas en Atención en Salud, con el fin de prevenir la resistencia a los antibióticos.
- Se recomienda al HUN tener en cuenta los resultados obtenidos en la presente investigación para mejorar sus protocolos de limpieza y desinfección, bioseguridad

y manejo de pacientes con IAAS con el fin de disminuir la diseminación de este microorganismo en los diferentes servicios.

- Dada la importancia del estudio y la implementación nacional de la vigilancia epidemiológica por medio del uso de secuenciación de genoma completo de microorganismos como el presente estudio realizado a partir de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas, se recomienda al HUN tener en cuenta la posibilidad de implementar nuevas tecnologías que integren la secuenciación de genoma completo al diagnóstico y tratamiento de IAAS, para con esto realizar un control efectivo de infecciones y además implementar el uso de terapias antibióticas específicas y personalizadas que promuevan un mejor control sobre la diseminación de microorganismos y elementos móviles como plásmidos asociados a la codificación de genes de resistencia en el ambiente hospitalario.

11. Anexos

Anexo 1. Formato de consentimiento informado para los pacientes



CONSENTIMIENTO INFORMADO



Diagnóstico molecular de resistencia, virulencia y seguimiento epidemiológico de bacterias Gram negativas multirresistentes causantes de IAAS, basado en secuenciación de genoma completo (WGS) y datos sociodemográficos y clínicos

Investigador principal: PhD. Emiliano Barreto Hernández

Código: _____

Iniciales del paciente _____ C.C. _____

INFORMACION PARA EL PACIENTE

Objetivo: realizar el diagnóstico molecular y el seguimiento epidemiológico de la resistencia y la virulencia de bacterias Gram negativas multirresistentes causantes de IAAS, a través de la implementación de una plataforma de secuenciación de genoma completo.

Justificación: mediante este formato se solicita su colaboración para participar en una investigación que tiene como objetivo realizar el diagnóstico molecular y el seguimiento epidemiológico de la resistencia y la virulencia de bacterias Gram negativas multirresistentes.

El estudio permitirá conocer los patrones de resistencia y virulencia de los microorganismos causantes de infecciones asociadas a la atención en salud.

SU PARTICIPACIÓN ES ABSOLUTAMENTE VOLUNTARIA Y NO AFECTARÁ SU ATENCIÓN MÉDICA

Procedimientos del estudio: para este estudio no se realizarán procedimientos o toma de muestras adicionales a las que su médico tratante ha ordenado. Los datos que queremos generar serán obtenidos mediante estudios que se realizarán a la(s) bacteria(s) obtenida(s) de los cultivos realizados durante la permanencia en esta institución y de la información que se encuentra en su historia clínica. Debido a lo anterior, si acepta participar en este estudio, NO será sometido intervenciones invasivas o mínimamente invasivas adicionales a las que recibiría si no acepta participar.

Su participación inicia a partir de la firma del presente consentimiento informado, en donde se autoriza el uso del microorganismo(s) aislado(s) a partir de cultivo(s), durante los 36 meses previstos para la realización del presente proyecto.

La(s) bacteria(s) obtenida(s) de cultivo(s) que será(n) utilizada(s) en esta investigación, se conservará(n) y almacenará(n) en el cepario del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por dos métodos: congelación a -80°C y liofilización.

Beneficios

La participación en este estudio no plantea ningún riesgo presente o a futuro para usted.

Confidencialidad

Solo el investigador principal y sus colaboradores sabrán que usted está participando en el estudio. Los registros que se hagan se harán identificándolo sólo con un código y no con el nombre. En caso de publicación de los resultados de este estudio, usted no será identificado por el nombre.

CONSENTIMIENTO INFORMADO	
VERSIÓN 01	
FECHA: 30-Agosto-2019	
Página: 1	
CONFIDENCIAL	

COMITÉ DE ÉTICA



CONSENTIMIENTO INFORMADO



Contacto: preguntas, aclaraciones e información adicional

En caso de dudas, preguntas o requerir aclaraciones, consultar con Mónica Rocío Aguilera Lozano líder de Epidemiología Área de Calidad, Corporación SALUDUN- Hospital Universitario Nacional, al teléfono 3904888 ext 12621 o al correo electrónico: monica.aguilera@hun.edu.co.

CONSENTIMIENTO

Para la realización de este estudio, permito el acceso al personal médico autorizado del Hospital Universitario Nacional de Colombia y a los investigadores de la Universidad Nacional de Colombia, adscritos al proyecto de investigación; a la recolección y análisis de la(s) bacteria(s) aisladas a partir de cultivo(s) y a la información clínica necesaria para el cumplimiento de los objetivos de este proyecto de investigación.

Autorizo informar los resultados clínicos de este estudio a las instituciones científicas designadas por los investigadores del proyecto y a las entidades que participen en esta investigación, para que los resultados se publiquen o se presenten en revistas de científicas y en congresos académicos, siempre y cuando se conserve la absoluta confidencialidad de mi nombre y datos personales.

Después de haber leído y entendido lo anterior, acepto voluntariamente participar en el estudio, firmando este formulario de consentimiento informado.

ACEPTO PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO: SI _____ NO _____

Iniciales del paciente

Firma del paciente y/o huella

Documento de identidad

Fecha

Nombre del testigo

Firma y C.C. del testigo

Teléfono y dirección

Parentesco

Persona que dirige el consentimiento informado

Firma y C.C

CONSENTIMIENTO INFORMADO VERSIÓN 01 FECHA: 30-Agosto-2019 Página: 1 CONFIDENCIAL	COMITÉ DE ÉTICA
--	-----------------

Anexo 2. Formato de seguimiento epidemiológico

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE BOGOTÁ	FORMATO DE SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO
---	--

INFORMACIÓN PACIENTE	
Código interno del paciente	
Nombres	
Apellidos	
Tipo de identificación	
N.º de identificación	
Sexo biológico	Masculino <input type="checkbox"/> Femenino <input type="checkbox"/> Sin determinar <input type="checkbox"/>
Fecha de nacimiento (DD/MM/AA)	
Municipio de procedencia	
Departamento de procedencia	

DATOS ESTANCIA HOSPITALARIA	
Fecha de ingreso al hospital (DD/MM/AA)	
Hospital	
Ciudad	

DATOS REMISIÓN				
Hospitalización previa (Últimos 3 a 6 meses)		SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		
Institución de remisión				
Ciudad				
Fecha de remisión (DD/MM/AA)				
Tiempo en el sitio de remisión (días)				
Dispositivos reportados (Sitio de remisión)				
Antibioticoterapia (Durante la estancia en el sitio de remisión)				
Uso de antimicrobianos a nivel intrahospitalario		SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		
Antibiótico	Dosis	Vía de administración	Inicio (DD/MM/AA)	Finalización (DD/MM/AA)
Pruebas/exámenes de laboratorio				
Examen realizado	Fecha (DD/MM/AA)	Resultado		
Reporte de IAAS				
Fecha de reporte de IAAS:				
Tipo de IAAS:				
Datos adicionales				

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE BOGOTÁ	FORMATO DE SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO
--	--

ANTECEDENTES (Últimos 3 a 6 meses)				
Antecedentes patológicos y/o quirúrgicos				
Procedimientos previos				
Procedimiento				Fecha
Antibioticoterapia				
Antibiótico	Dosis	Vía de administración	Inicio (DD/MM/AA)	Finalización (DD/MM/AA)
Pruebas/exámenes de laboratorio				
Examen realizado		Fecha (DD/MM/AA)	Resultado	
Datos adicionales				

COMORBILIDADES: Índice de Charlson	
Marque con una "X" la presencia de las siguientes comorbilidades:	
Infarto de miocardio (1 punto)	
Insuficiencia cardíaca congestiva (1 punto)	
Enfermedad vascular periférica (2 puntos)	
Enfermedad cerebrovascular (1 punto)	
Demencia (1 punto)	
EPOC (1 punto)	
Enfermedad tejido conectivo (1 punto)	
Hepatopatía leve (1 punto)	
Úlcus péptico (1 punto)	
DM sin afectación orgánica (1 punto)	
DM con afectación orgánica (2 puntos)	
Hemiplejía (2 puntos)	
IRC (2 puntos)	
Tumor sin metástasis (2 puntos)	
Leucemia (2 puntos)	
Linfoma (2 puntos)	
Enfermedad hepática moderada severa (3 puntos)	
Tumor sólido con metástasis (6 puntos)	
SIDA (6 puntos)	
Total:	

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE BOGOTÁ	FORMATO DE SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO
--	--

EVENTO				
N.º Evento				
Servicio				
N.º Cama o Sala				
Fecha de ingreso (DD/MM/AA)				
Diagnóstico de ingreso al servicio				
Dispositivos				
Dispositivos		Fecha de colocación (DD/MM/AA)	Fecha de retiro DD/MM/AA)	
Procedimientos				
Procedimiento		Sala/Quirófano	Fecha	
Antibioticoterapia				
Antibiótico	Dosis	Vía de administración	Inicio (DD/MM/AA)	Finalización (DD/MM/AA)
Muestras				
Tipo de muestra	Fecha de recepción laboratorio (DD/MM/AA)	Fecha de resultado (DD/MM/AA)	Resultado	Código aislamiento
Sangre --- Orina --- Secreción de herida --- Espudo --- Lavado bronco alveolar --- S. trequesii --- LDR --- Piel y tejidos blandos --- Otro --- ¿Cuál? <u>LO PERTONEAL</u>				
Sangre --- Orina --- Secreción de herida --- Espudo --- Lavado bronco alveolar --- S. trequesii --- LDR --- Piel y tejidos blandos --- Otro --- ¿Cuál? _____				
Reporte de IAAS				
Fecha de reporte de IAAS:				
Tipo de IAAS:				
Datos de egreso del servicio				
Fecha de salida (DD/MM/AA)				
Motivo de egreso del servicio				

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE BOGOTÁ	FORMATO DE SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO
---	--

PUNTUACIÓN APACHE II DE INGRESO: solo pacientes UCI (primeras 24h)	
Número del evento	
Temperatura (°C)	
Pres. arterial media	
Frecuencia Cardíaca	
Frecuencia Respiratoria	
A ⁺ PO ₂ (FiO ₂ >50 %) o PaO ₂ (FiO ₂ <50 %)	
pH arterial o HCO ₃	
Na ⁺ sérico (mEq/l)	
K ⁺ sérico (mEq/l)	
Creatinina sérica	
Hematocrito	
Recuento de leucocitos	
Glasgow	
Edad en años	
Problemas crónicos de salud: Marque con una "X":	
Ninguno	
No quirúrgico	
Operación quirúrgica urgente	
Operación quirúrgica programada	

DESENLACE	
Tipo de desenlace	Egreso: <input type="checkbox"/> Difunto: <input type="checkbox"/> Retiro voluntario: <input type="checkbox"/>
Fecha del desenlace (DD/MM/AA)	14/01/2020
COMENTARIOS ADICIONALES	

Anexo 3. Características epidemiológicas de los aislamientos de *K. pneumoniae* en estudio

Cosecutivo	N° paciente	N° historia clínica	Codigo HUN	Tipo de muestra	Fecha recepción laboratorio HUN	Edad	Género	Servicio de aislamiento	Habitación	Tipo de IASS	Desenlace
Kp001	1	17.143.608	121700111	HEMO 2	17/12/19	75	M	UCI	22	INTRA INSTITUCIONAL	FALLECIDO
Kp002		17.143.608	121700121	HEMO3	17/12/19	75	M	UCI	22		
Kp004	2	19.247.428	10301541	URO	4/01/20	65	M	UCI	28	INTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp005	3	20.296.034	10901251	HEMO 3	9/01/20	78	F	HOSPITALIZACIÓN	304B	INTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp006		20.296.034	10901231	HEMO 1	9/01/20	78	F	HOSPITALIZACIÓN	304B		
Kp007	4	25.169.711	11100061	URO	12/01/20	63	F	HOSPITALIZACIÓN	210	INTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp008	5	1.030.534.411	13000411	URO	2/02/20	32	F	UCI	2	INTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp009	6	17.079.939	20101901	URO	3/02/20	77	M	HOSPITALIZACIÓN	342	INTRA INSTITUCIONAL	FALLECIDO
Kp011	7	39.799.466	22700501	LIQUIDO PERITONEAL	28/02/20	47	F	UCI	24	INTRA INSTITUCIONAL	FALLECIDO
Kp012		39.799.466	22500392	LIQUIDO PERITONEAL	26/02/20	47	F	UCI	24		
Kp013	8	1.121.824.173	30502011	HEMO 3	7/03/20	33	M	UCI	32	INTRA INSTITUCIONAL	FALLECIDO
Kp014		1.121.824.173	30300881	LAVADO BRONCOALVEOLAR	4/03/20	33	M	UCI	32		
Kp015		1.121.824.173	30100212	LAVADO BRONCOALVEOLAR	3/03/20	33	M	UCI	32		
Kp016	9	1.030.542.894	30701881	HEMO 3	8/03/20	32	F	UCIN	15	INTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp017	10	19.067.897	41601332	HUESO VERTEBRAL	18/04/20	71	M	UCIN	6	INTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp018		19.067.897	40901602	TEJIDO DE COLUMNA	12/04/20	71	M	HOSPITALIZACIÓN	212	INTRA INSTITUCIONAL	
Kp019		19.067.897	41601322	SECRECIÓN DE COLUMNA	16/04/20	71	M	UCIN	6	INTRA INSTITUCIONAL	
Kp021	12	1.075.209.109	31901711	HUESO SACRO	23/03/20	34	M	HOSPITALIZACIÓN	332	INTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp022	13	1.030.542.894	30801452	ABSCESO HERIDA QUIRURGICA ABDOMINAL	8/03/20	32	F	UCIN	15	INTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp023		1.030.542.894	30701861	CATETER VENOSO CENTRAL	8/03/20	32	F	UCIN	15	INTRA INSTITUCIONAL	
Kp024	14	17.095.636	53000934	URO	1/06/20	76	M	UCI	26	EXTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp025	15	243.634	61200061	URO	13/06/20	96	M	HOSPITALIZACIÓN	333	EXTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp026	16	17.147.946	62600642	HEMO 3	27/06/20	74	M	UCI	22	INTRA INSTITUCIONAL	FALLECIDO
Kp027	17	17.142.047	70300032	HEMO 1	3/07/20	74	M	UCI	32	INTRA INSTITUCIONAL	FALLECIDO
Kp029	18	23.605.004	72600301	HEMO 3	26/07/20	75	F	HOSPITALIZACIÓN	305A	INTRA INSTITUCIONAL	HOSPITALIZADA
Kp030		23.605.004	72600292	HEMO 2	26/07/20	75	F	HOSPITALIZACIÓN	305A	INTRA INSTITUCIONAL	
Kp031		23.605.004	7301902	HEMO 2	30/07/20	75	F	HOSPITALIZACIÓN	349	INTRA INSTITUCIONAL	
Kp032	19	28.427.880	91502452	HEMO 3	15/09/20	61	F	UCI	25	INTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp033		28.427.880	91502412	HEMO 1	15/09/20	61	F	UCI	25	INTRA INSTITUCIONAL	
Kp034		28.427.880	91600272	SOT	17/09/20	61	F	UCI	25	INTRA INSTITUCIONAL	
Kp035	20	24.568.115	102200112	HEMO 3	24/10/20	76	F	UCI	20	EXTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp036		24.568.115	2010220009	HEMO 1	22/10/20	76	F	UCI	20	EXTRA INSTITUCIONAL	
Kp037	21	1.022.406.344	102300552	SOT	24/10/20	25	F	UCI	18	EXTRA INSTITUCIONAL	FALLECIDA
Kp038	22	1.032.373.024	103002452	TEJIDO GRANULOSO DE CUELLO	2/11/20	34	M	HOSPITALIZACIÓN	314A	INTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp039	23	17.139.738	110501812	URO	6/11/20	75	M	HOSPITALIZACIÓN	435	EXTRA INSTITUCIONAL	FALLECIDO
Kp040	24	13.446.333	121101671	URO	14/12/20	61	M	UCI	22	INTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA
Kp041	25	1.010.077.788	60201182	URO	20/06/20	25	M	HOSPITALIZACIÓN	210	INTRA INSTITUCIONAL	EGRESO ALTA MEDICA

Anexo 4. Resultados caracterización bioquímica para *K. pneumoniae*

RESULTADOS CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA <i>K. pneumoniae</i>						
Código/ aislamiento	UREA	CITRATO	SIM	TSI	SIM (INDOL)	Resultado
Kp001	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp002	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp004	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp005	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp006	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp007	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp008	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp009	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp011	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp012	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp013	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp014	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp015	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp016	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp017	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp018	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp019	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp021	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp022	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp023	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp024	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp025	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp026	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp027	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp029	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp030	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp031	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp032	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp033	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp034	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp035	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp036	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp037	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp038	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp039	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp040	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>
Kp041	+	+	-	A/A Gas	-	<i>K. pneumoniae</i>

Anexo 6. Matriz de identidad de nucleótidos promedio ANI para los aislamientos de *K. pneumoniae* secuenciados

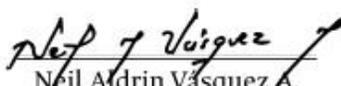
	Kp001	Kp002	Kp004	Kp005	Kp006	Kp007	Kp008	Kp009	Kp011	Kp012	Kp013	Kp014	Kp015	Kp016	Kp017	Kp018	Kp019	Kp021	Kp022	Kp023	Kp024	Kp025	Kp026	Kp027	Kp029	Kp030	Kp031	Kp032	Kp033	Kp034	Kp035	Kp036	Kp037	Kp038	Kp039	Kp040	Kp041
Kp001	100	99.994	99.991	99.989	99.982	98.997	98.991	99.993	99.926	99.943	98.860	98.892	98.916	99.170	99.936	99.949	99.919	99.931	99.168	99.181	94.853	98.964	99.109	99.022	99.937	99.015	99.014	98.991	98.991	99.992	99.993	99.993	99.975	99.972	99.163	99.021	98.961
Kp002	99.994	100	99.998	99.994	99.989	98.985	98.986	99.992	99.932	99.942	98.908	98.921	98.945	99.187	99.934	99.936	99.928	99.934	99.188	99.194	94.861	98.949	99.092	99.031	99.942	99.021	99.017	99.006	99.006	99.994	99.993	99.995	99.981	99.977	99.130	99.035	98.985
Kp004	99.991	99.998	100	99.995	99.991	98.964	98.992	99.993	99.915	99.931	98.879	98.953	98.944	99.190	99.928	99.933	99.931	99.920	99.185	99.190	94.880	98.954	99.123	99.028	99.932	99.022	98.990	99.001	99.001	99.996	99.994	99.992	99.988	99.986	99.105	99.041	98.980
Kp005	99.989	99.994	99.995	100	99.990	98.995	98.999	99.994	99.935	99.939	98.870	98.919	98.931	99.179	99.956	99.947	99.921	99.931	99.163	99.182	94.863	98.942	99.109	99.011	99.943	99.027	99.016	99.003	99.003	99.988	99.990	99.990	99.986	99.973	99.134	99.020	98.978
Kp006	99.982	99.989	99.991	99.990	100	98.997	98.978	99.991	99.925	99.935	98.864	98.933	98.939	99.191	99.944	99.928	99.931	99.931	99.174	99.184	94.852	98.955	99.103	99.014	99.928	99.011	99.012	99.000	99.000	99.990	99.988	99.988	99.983	99.973	99.131	99.012	98.967
Kp007	98.997	98.985	98.964	98.995	98.997	100	99.994	98.976	99.052	99.106	99.024	99.050	99.066	98.964	99.072	99.078	99.071	99.080	98.979	98.929	94.764	99.162	98.982	99.104	99.071	99.991	99.993	99.987	99.987	99.022	98.992	99.005	99.017	99.005	98.760	98.941	99.117
Kp008	98.991	98.986	98.992	98.999	98.978	99.994	100	98.981	99.067	99.098	98.968	99.046	99.050	98.970	99.055	99.058	99.066	99.085	98.973	99.935	94.770	99.151	98.977	99.078	99.052	99.993	99.994	99.993	99.993	99.012	98.985	99.003	99.025	99.007	98.746	98.967	99.121
Kp009	99.993	99.992	99.993	99.994	99.991	98.976	98.981	100	99.933	99.932	98.837	98.928	98.933	99.177	99.918	99.930	99.922	99.911	99.176	99.169	94.863	98.929	99.108	98.992	99.933	99.008	98.988	99.005	99.005	99.990	99.993	99.991	99.973	99.982	99.114	99.020	98.957
Kp011	99.926	99.932	99.915	99.935	99.925	99.052	99.067	99.933	100	99.988	98.980	99.011	99.007	99.168	99.986	99.984	99.993	99.984	99.126	99.152	94.777	99.042	99.126	99.107	99.992	99.077	99.072	99.064	99.064	99.938	99.940	99.942	99.929	99.913	99.086	99.034	99.050
Kp012	99.943	99.942	99.931	99.939	99.935	99.106	99.098	99.932	99.988	100	98.950	98.990	99.007	99.122	99.991	99.994	99.994	99.982	99.133	99.125	94.797	99.054	99.116	99.119	99.988	99.121	99.105	99.091	99.091	99.942	99.947	99.945	99.927	99.940	99.124	99.050	99.040
Kp013	98.860	98.908	98.879	98.870	98.864	99.024	98.968	98.837	98.980	98.950	100	99.941	99.948	98.852	98.952	98.923	98.931	98.969	98.843	98.802	94.773	98.995	98.837	99.075	98.950	99.012	99.002	99.005	99.005	98.919	98.895	98.895	98.855	98.874	98.464	98.837	98.975
Kp014	98.892	98.921	98.953	98.919	98.933	99.050	99.046	98.928	99.011	98.990	99.941	100	99.992	98.880	99.001	98.990	98.994	99.000	98.878	98.835	94.801	99.061	98.903	99.118	98.989	99.069	99.053	99.049	99.049	98.950	98.938	98.959	98.928	98.940	98.620	98.878	99.018
Kp015	98.916	98.945	98.944	98.931	98.939	99.066	99.050	98.933	99.007	99.007	99.948	99.992	100	98.852	99.016	98.979	99.017	99.002	98.884	98.835	94.771	99.069	98.935	99.138	98.991	99.064	99.060	99.051	99.051	98.975	98.975	98.975	98.909	98.921	98.627	98.896	99.028
Kp016	99.170	99.187	99.190	99.179	99.191	98.964	98.970	99.177	99.168	99.122	98.852	98.880	98.852	100	99.128	99.121	99.136	99.133	99.990	99.992	94.835	98.863	99.788	98.888	99.116	98.975	98.986	98.970	98.970	99.141	99.179	99.187	99.163	99.159	98.777	99.028	98.903
Kp017	99.936	99.934	99.928	99.956	99.944	99.072	99.055	99.918	99.986	99.991	98.952	99.001	99.016	99.128	100	99.991	99.982	99.979	99.137	99.130	94.780	99.035	99.118	99.090	99.988	99.075	99.071	99.060	99.060	99.956	99.949	99.951	99.927	99.922	99.084	99.037	99.013
Kp018	99.949	99.935	99.933	99.947	99.928	99.078	99.058	99.930	99.984	99.994	98.923	98.990	98.979	99.121	99.991	100	99.995	99.983	99.115	99.110	94.771	99.067	99.106	99.106	99.989	99.087	99.091	99.085	99.085	99.939	99.949	99.935	99.933	99.921	99.097	99.022	99.020
Kp019	99.919	99.928	99.931	99.931	99.931	99.071	99.066	99.922	99.993	99.994	98.931	98.994	99.017	99.136	99.982	99.995	100	99.977	99.130	99.142	94.765	99.067	99.114	99.100	99.987	99.086	99.068	99.075	99.075	99.934	99.927	99.926	99.920	99.895	99.074	99.039	99.028
Kp021	99.931	99.934	99.920	99.933	99.931	99.080	99.085	99.911	99.984	99.982	98.969	99.000	99.002	99.133	99.979	99.983	99.977	100	99.126	99.118	94.799	99.048	99.098	99.074	99.977	99.101	99.090	99.083	99.083	99.941	99.937	99.944	99.901	99.917	99.086	99.026	99.036
Kp022	99.168	99.188	99.185	99.163	99.174	98.979	98.973	99.176	99.126	99.133	98.843	98.878	98.884	99.990	99.137	99.115	99.130	99.126	100	99.993	94.839	98.851	99.787	98.892	99.121	98.987	98.990	98.991	98.991	99.164	99.174	99.167	99.167	99.177	98.722	99.018	98.884
Kp023	99.181	99.194	99.190	99.182	99.184	98.929	98.935	99.169	99.152	99.125	98.802	98.835	98.835	99.992	99.130	99.110	99.142	99.118	99.993	100	94.808	98.860	99.784	98.884	99.120	98.934	98.953	98.971	98.971	99.153	99.179	99.184	99.175	99.162	98.732	99.013	98.891
Kp024	94.853	94.861	94.880	94.863	94.852	94.764	94.770	94.863	94.777	94.797	94.773	94.801	94.771	94.835	94.780	94.771	94.765	94.799	94.839	94.808	100	94.833	94.802	94.764	94.797	94.781	94.781	94.802	94.802	94.916	94.897	94.918	94.900	94.897	94.686	94.695	94.906
Kp025	98.964	98.949	98.954	98.942	98.955	99.162	99.151	98.929	99.042	99.054	98.995	99.061	99.069	98.863	99.035	99.067	99.067	99.048	98.851	98.860	94.833	100	98.954	99.055	99.041	99.180	99.179	99.153	99.153	98.970	98.979	98.965	98.950	98.947	98.580	98.824	99.003
Kp026	99.109	99.092	99.123	99.109	99.103	98.982	98.977	99.108	99.126	99.116	98.837	98.903	98.935	99.788	99.118	99.106	99.114	99.098	99.787	99.784	94.802	98.954	100	98.944	99.085	99.015	99.018	98.985	98.985	99.107	99.111	99.100	99.069	99.078	98.720	98.942	98.935
Kp027	99.022	99.031	99.028	99.011	99.014	99.104	99.078	98.992	99.107	99.119	99.075	99.118	99.138	98.888	99.090	99.106	99.100	99.074	98.892	98.884	94.764	99.055	98.944	100	99.103	99.110	99.084	99.100	99.100	99.038	99.025	99.032	99.044	99.034	98.665	98.941	99.015
Kp029	99.937	99.942	99.932	99.943	99.928	99.071	99.052	99.933	99.992	99.988	98.950	98.989	98.991	99.116	99.988	99.989	99.987	99.977	99.121	99.120	94.797	99.041	99.085	99.103	100	99.086	99.073	99.076	99.076	99.938	99.942	99.936	99.929	99.908	99.051	99.002	99.024
Kp030	99.015	99.021	99.022	99.027	99.011	99.991	99.993	99.008	99.077	99.121	99.012	99.069	99.064	98.975	99.075	99.087	99.086	99.101	98.987	98.934	94.781	99.180	99.015	99.110	99.086	100											

11.1.1 Anexo Divulgación

Anexo 11.11.1 Certificado de participación en el Segundo Simposio virtual de estudiantes y egresados en Biotecnología y Áreas afines, en el año 2020 como ponente en modalidad oral.




Sonia Amparo Ospina S.
Presidenta Comité Científico
Facultad Ciencias - IBUN
Sede Bogotá


Neil Adrin Vásquez A.
Representante Área Curricular
Biotecnología
Facultad de Ciencias
Sede Medellín

IBUN-2020-SO12

Anexo 11.11.2 Certificado de participación en el tercer Simposio virtual de estudiantes y egresados en Biotecnología y Áreas afines, en el año 2022 como ponente en modalidad poster.



12. Bibliografía

Abel, C. (1996). Ensayos de historia de la salud en Colombia: 1920-1990 (Vol. 37). Universidad Nacional de Colombia. IEPRI - CEREC. <http://bdigital.unal.edu.co/43072/>

Alvarez, C., Cortes, J., Arango, Á., Correa, C., Leal, A., & Grebo. (2006). Resistencia antimicrobiana en Unidades de Cuidado Intensivo de Bogotá, Colombia, 2001-2003. *Revista de Salud Publica*. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642006000400008>

Argimón, S., Abudahab, K., Goater, R. J. E., Fedosejev, A., Bhai, J., Glasner, C., Feil, E. J., Holden, M. T. G., Yeats, C. A., Grundmann, H., Spratt, B. G., & Aanensen, D. M. (2016). Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microbial Genomics*, 2(11), e000093. <https://doi.org/10.1099/MGEN.0.000093>

BiOptic inc (2016) Qsep100™ Operation Manual English V1.6. www.bioptic.com.tw

Chaves, J., Ladona, M. G., Segura, C., Coira, A., Reig, R., & Ampurdanés, C. (2001). SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2856-2861.2001>

de Software, W. (n.d.). Organización Mundial de la Salud. Sf Medicamentos Esenciales y Productos Para La Salud Fecha de Consulta 06 de Noviembre https://www.who.int/medicines/areas/rational_use/AMR_WHONET_SOFTWAREEn, 2019 SRC.

Cantón, R. (2023) Simposio Problemas emergentes de multiresistencia de interés clínico: perspectiva global y epidemiología en Latinoamérica- Problemas emergentes de multiresistencia de interés clínico a nivel global. Junio 27 2023

Bolger, A., Lohse, M. y Usadel, B. 2014. Trimmomatic: Un relector flexible para Illumina sequence data. *Bioinformática* 30(12):175-176.

Celis, Y., Rubio, V y Camacho, M. 2017. Perspectiva del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 19(2): 105-107.

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC). Signos vitales: enterobacterias resistentes a carbapenémicos *MMWR Morb Mortal Wkly ep*2013;62: 165–70

Chen L, Anderson D, Paterson D. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist* 2012; 5:133-41.

David, S., Reuter, S., Harris, S., Gasner, C., *et al.* 2019. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat. Microbiol.* 4: 1919–1929.

De la Cadena, E., Mojica, M., García, J., *et al.* 2021. Molecular analysis of polymyxin resistance among carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Colombia.

Antibiotics, 10(3), 284.

Echeverri Toro, L. M., & Cataño Correa, J. carlos. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: Epidemiología y resistencia. *Iatreia*.

Falco, A., Barrios, Y., Torres, L., Sandrea, L y Takiff, H. 2017. Epidemiología molecular de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasas tipo KPC provenientes de dos hospitales públicos en los estados Carabobo y Zulia, Venezuela. *Investigación clínica*, 58(1).

García, y., Filott, M., Campo, M., Gómez, L., Bettin, A. 2020. Perfiles de los fenotipos de resistencia en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en Barranquilla, Colombia. *Revista Ciencias Biomédicas*, 9(1): 15-24. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2021. Geneva: World health Organization, 2021.

Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2014. Geneva: World health Organization, 2014.

García-Fulgueiras, V., Zapata, Y., Papa-Ezdra, R., Ávila, P., Caiata, L., Seija, V., Rojas Rodríguez, A. E., Magallanes, C., Márquez Villalba, C., & Vignoli, R. (2020). First characterization of *K. pneumoniae* ST11 clinical isolates harboring blaKPC-3 in Latin America. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3). <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.10.003>

Gelle, B., & Field, K. (2012). *Molecular Microbiology Laboratory* (2nd ed.).

Grupo de Microbiología, S. D. . Instituto Nacional de Salud. (2018). Obtenido de INFORME DE RESULTADOS DE LA VIGILANCIA POR LABORATORIO DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCION EN SALUD IAAS <https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/Informacion/20de20laboratorio/InformeVigilanciaPorLaboratorioResistenciaAntimi>, 2018 SRC.

Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150–161. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2019.06.003>

INSTITUT PASTEUR. (n.d.). *Klebsiella Pasteur MLST database*.

Illumina. (2020). *Illumina DNA Prep Reference Guide Consumable*. In Illumina (Issue June). https://support.illumina.com/content/dam/illumina/support/documents/documentation/chemistry_documentation/illumina_prep/illumina_dna_prep_reference_guide-1000000025416-09.pdf

Instituto Nacional de Salud. (2019) Informe vigilancia por Whonet de Resistencia antimicrobiana en IAAS.

Instituto Nacional de Salud. Dirección de redes en salud pública. Informe de resultados de la vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud IAAS (2018).

Jain, C., Rodriguez-R. L., Phillippy, A., *et al.* 2018. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9: 5114.

Jiménez, M., Galas, M., Corso, A., *et al.* 2019. Concenso Lationamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 43:e65.

Köser, C. U., Ellington, M. J., Cartwright, E. J. P., Gillespie, S. H., Brown, N. M., Farrington, M., Holden, M. T. G., Dougan, G., Bentley, S. D., Parkhill, J., & Peacock, S. J. (2012). Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002824. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=22876174&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum

Leal, A. L., Schmalbach, J. E., & Buitrago, G. (2006). Ivarez, C., & Méndez, M. . Canales endémicos y marcadores de resistencia bacteriana, en instituciones de tercer nivel de Bogota, Colombia. *Revista de Salud Publica*.

Lina, M., & Zulma, V. (2000). Echeverri-Toro, Rueda, Maya, Wilmar, Agudelo, Yuli, & Ospina, Sigifredo. . *Klebsiella pneumoniae* multi-resistente, factores predisponentes y mortalidad asociada en un hospital universitario en Colombia. *Revista Chilena de Infectologia* [Httpsdxdoiorg104067S071610109_29\(2\)DOI-10.4067/S0716-10182012000200009](https://doi.org/10.4067/S071610109_29(2)DOI-10.4067/S0716-10182012000200009) SRC-BaiduScholar FG-0), 175–182.

López Vargas, J. A., & Echeverri Toro, L. M. (2010). *K. pneumoniae*: ¿The new “superbacteria”? Pathogenicity, epidemiology and resistance mechanisms. *Iatreia*.

López J A, Correa A, Navon-Venezia S, Correa A L, Torres J A, Briceño D F, *et al.* Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3 producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 52-6.

Lee C R, Lee J H, Park K S, Kim Y B, Jeong B C, Lee S H. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol* 2016; 7: 895.

López, D., Torres, M. y Parda, C. 2015. Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: impacto en la salud pública en Colombia. *Revista Universidad y Salud*, 18(1): 190-202.

López, J y Echeverri, L. 2010. *K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Revista Iatreia*, 23(2).

Martin, J., T Phan, H., Findlay J., *et al.* 2017. Covert dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) in a successfully controlled outbreak: long-and short-read whole-genome sequencing demonstrate multiple genetic modes of transmission. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72(11): 3025-3034.

Llacsá, P. J., Huarcaya, J. M., Melgarejo, G. C., Gonzales, L. F., Cahuana, J., Pari, R. M., & Chacaltana, J. (2015). Tejada ... Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. *Anales de La Facultad de Medicina* [Httpsdoiorg1015381analesv76i211143](https://doi.org/10.15381/analesv76i211143).

Martínez, D., Araque, Y., Roduifo, H., *et al.* 2016. Relación clonal y detección del gen blaKPC en cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, en un hospital de Venezuela. *Revista Chilena de Infectología*. 33(5).

Merchán Reyes, J. J. ., & Gerardo Ortiz , J. . (2021). Mecanismos de resistencia en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*. *Revista Vive*, 4(12), 443–456. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i12.105>

Naas, T, *et al.* 2008. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrobial Agents Chemother* 52, 1257–1263.

Marquez-Ortiz, R. A., Haggerty, L., Sim, E. M., Duarte, C., Castro-Cardozo, B. E., Beltran, M., Saavedra, S., Vanegas, N., Escobar-Perez, J., & Petty, N. K. (n.d.). First Complete *Providencia rettgeri* Genome Sequence, the NDM-1-Producing Clinical Strain RB151. *Genome Announcements*, 5(3).

Nordmann P. 2014. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect* 2014; 44(2): 51-56.

N,Turton JF,Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance . *FEMS Microbiol Rev* 2011 ;35:736–55

Ordóñez Smith, M. (2014). *Guías Prácticas Para los Laboratorios de Bacteriología Clínica* (1st ed.).

Organización Mundial de la Salud. (2003). *Prevención de Las Infecciones Nosocomiales* Guía Práctica 2a Edición 65pt.

Organización Panamericana de la salud. (2011). *Manual de control de infecciones y epidemiología hospitalaria* última actualización Enero 2023.

Oteo, J., Calvo, E., Rodríguez, J., *et al.* (2014). La amenaza de las enterobacterias productoras de carbapenemasas en España: documento de posicionamiento de los grupos de estudio GEIH y GEMARA de la SEIMC. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 34(10): 666-670.

OXOID. (s.f.). *MEDIOS DE CULTIVO DESHIDRATADOS*. (2019).

Peterson, L. R. (n.d.). Bad bugs, no drugs: no ESCAPE revisited. *Clinical Infectious Diseases* : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America, 49(6), 992–993.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=19694542&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum

Pasternan , F. (2023) Simposio Problemas emergentes de multiresistencia de interés clínico: perspectiva global y epidemiología en Latinoamérica- Epidemiología en Latinoamérica de Bacilos Gram negativos (2023)

Pujol, M., & Limon, E. (2013). Public Health Agency of Canada. (Vol. 31, Issues 2 SRC-BaiduScholar FG-0).

Quainoo, S., Coolen, J., van Hijum, S., Huynen, M., Melchers W., *et al.* (2017). Whole-Genome Sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis. *ASM Journal, Clinical Microbiology Reviews*, 30, No.4.

Rada, A., Hernández, C., Restrepo, C., Villegas, M. 2019. Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia 2001-2016. *Biomédica*, 39(1)

Rada, A., Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016

Rice, L. B. (n.d.). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079–1081. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=18419525&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum

Rodríguez, E. C., Saavedra, S. Y., Leal, A. L., Álvarez, C., Olarte, N., Valderrama, A., Cuervo, S. I., & Escobar, J. (2014). Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. *Biomedica*, 34(SUPPL.1). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1696>

Rojas, L., Weinstock, G., De La Cadena, E., Díaz, L., *et al.* 2018. An Analysis of the Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: Convergence of Two Evolutionary Mechanisms Creates the “Perfect Storm”. *Journal of Infection Diseases*. 217: 82-92.

Sahly, H., Navon-Venezia, S., *et al.* 2008. Extended-spectrum β -lactamase production is associate with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 3029-3034.

Saavedra, C. H., Ordóñez, K. M., & Díaz, J. A. (n.d.). [Nosocomial infections impact in a hospital in Bogota, Colombia: effects on mortality and hospital costs]. *Revista Chilena de Infectología: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 32(1), 25–29. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=25860040&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum sucesos del laboratorio. (2019).

Saavedra, S. Y., Bernal, J. F., Montilla-Escudero, E., Arévalo, S. A., Prada, D. A., Valencia, M. F., Moreno, J., Hidalgo, A. M., García-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. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab777>

Simmons, M. P., & Goloboff, P. A. (2014). Dubious resolution and support from published sparse supermatrices: The importance of thorough tree searches. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 78(1), 334–348. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2014.06.002>

Tejada Llacsá, P. J., Huarcaya, J. M., Melgarejo, G. C., Gonzales, L. F., Cahuana, J., Pari, R. M., Bohorquez, H. L., & Chacaltana, J. (2015). Caracterización de infecciones por bacterias productoras de BLEE en un hospital de referencia nacional. *Anales de La Facultad de Medicina*. <https://doi.org/10.15381/anales.v76i2.11143>

Thermo Fisher Scientific Inc., (2021). Qubit™ 4 Fluorometer User Guide .

Valenzuela, T., Prat, S., Santolaya, E. 2003. Implementación de una red nacional para la vigilancia de resistencia de agentes patógenos a antimicrobianos según síndromes clínicos. *Revista Chilena de Infectología*. 20(2): 119-125.

Velásquez, J., Hernández, R., Pamo, O., Candiotti, M., Pinedo, Y., Sacsquispe, R., Suárez, L., & Fernández, N. (2013). *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. *Rev Soc Peru Med Interna*.

Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M., Bello-Toledo, H., & González-Rocha, G. (n.d.). [*KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, main carbapenemase in Enterobacteriaceae]. *Revista Chilena de Infectología: Organó Oficial de La Sociedad Chilena de Infectología*, 34(5), 476–484.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=29488590&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum

Victoria, E., Meza, Q., & Varón Rodríguez, C. (n.d.). CARACTERIZACIÓN DE LA COLONIZACIÓN POR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS EN PACIENTES PROVENIENTES DE UCI.

Villa, L., Feudi, C., Fortini, D., *et al.* 2017. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microbial Genomics*. 3(4)

Villalobos, A. P., Barrero, L. I., Rivera, S. M., Ovalle, M. V., & Valera, D. (2014). Vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud, resistencia bacteriana y consumo de antibióticos en hospitales de alta complejidad, Colombia, 2011. *Biomedica*. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1698>

Willyard, C. (2017). The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature.2017.21550>

WHO. (2017). World Health Organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. https://doi.org/10.4103/jms.jms_25_17

Yauri, M., Rodríguez, M y Alcocer, I. 2020. Diseminación clonal de *KPC-2 en Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos. *Infectología*. 24(1).

Zhaoyinqian Li, Zixuan Ding, Jia Yang, *et al.* 2022. Characteristics and risk factors caused by KPC and NDM producers. *Infection and Drug Resistance*. 14: 3145-3158.