

CARACTERIZACIÓN DE LA COLONIZACIÓN POR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS EN PACIENTES PROVENIENTES DE UCI

**Elen Victoria Quintero Meza
Carolina Varón Rodríguez**

**Universidad El Bosque
Facultad de Medicina
Pregrado en Medicina
Bogotá
2022**

CARACTERIZACIÓN DE LA COLONIZACIÓN POR *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* RESISTENTES A CARBAPENÉMICOS EN PACIENTES PROVENIENTES DE UCI

**Elen Victoria Quintero Meza
Carolina Varón Rodríguez**

**Directora: Jinnethe Cristina Reyes Manrique
Unidad de Genética y Resistencia Antimicrobiana (UGRA)**

Trabajo de Grado para Optar por el Título de Médico Cirujano

**Universidad El Bosque
Facultad de Medicina
Pregrado en Medicina
Bogotá
2021**



La Universidad El Bosque no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestros agradecimientos a la Universidad El Bosque, por abrirnos sus puertas al mundo del aprendizaje, brindarnos tantas oportunidades, enriquecernos en conocimiento. y permitirnos realizar todo nuestro proceso de formación como médicos.

Agradecemos a los miembros del equipo UGRA, a Rafael Ríos, Lorena Díaz, Sandra Vargas, Aura Echeverri y demás miembros de esta familia, en especial a Jinnethe Reyes nuestra directora de tesis, por guiar esta investigación, por su confianza, esfuerzo y dedicación y formar parte de otro logro alcanzado en nuestras vidas.

Agradecemos a todos nuestros docentes, quienes con su sabiduría, experiencia, conocimiento y apoyo nos motivaron a crecer como personas y profesionales.

Agradecemos a la Organización Clínica General del Norte de Barranquilla y al Hospital Universitario San Jorge de Pereira por permitirnos realizar nuestra investigación en sus instalaciones.

Agradecemos a Dios por ser nuestra guía y acompañarnos en el transcurso de nuestras vidas personales y profesionales.

Agradecemos a nuestras familias, por ser pilares en nuestras vidas, por su apoyo y amor incondicional.

Gracias infinitas.

Dedicatoria

A nuestros padres por su amor, apoyo, trabajo y sacrificio durante todos estos años. Es un orgullo ser sus hijas. A nuestros hermanos por sus risas, apoyo y amor. A los demás miembros de nuestras familias por su compañía.

A nuestros amigos quienes se volvieron nuestra segunda familia, compañeros de experiencias y vida, futuros colegas, gracias por todo su amor y diversión, los amamos.

Tabla de contenido

<i>Tabla de contenido</i>	6
<i>Introducción</i>	16
<i>Planteamiento del problema</i>	18
<i>Pregunta de investigación</i>	21
<i>Justificación</i>	22
<i>Tipo de estudio</i>	23
<i>Objetivo general</i>	23
Objetivos específicos	23
<i>Marco teórico</i>	24
7.1 Generalidades IAAS	24
7.2 MDRO más frecuentes	27
7.3 Enterobacteriales	29
7.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
7.5 Mecanismos de resistencia a antibióticos en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	38
7.5.1 Betalactámicos.....	38
7.5.2 Quinolonas.....	39
7.5.3 Aminoglucósidos.....	40
7.5.4 Polimixinas (Colistina).....	40

7.5.7 Tetraciclinas.....	42
7.5.8 Trimetoprim y Sulfonamidas	42
7.5.9 Rifamicinas.....	43
7.6 Complejos clonales en <i>K. pneumoniae</i> y su diseminación.....	43
7.7 <i>Klebsiella pneumoniae</i> asociada a IAAS e Infección en UCI.....	47
7.8 Epidemiología de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	52
7.9 Microbioma humano.....	57
<i>Metodología</i>.....	61
8.1 Tipo de estudio	61
8.2 Evento.....	61
8.3 Población y selección de participantes	61
8.4 Criterios de inclusión	61
8.5 Criterios de exclusión.....	61
8.6 Instituciones participantes	61
8.7 Variables de estudio	62
8.8 Instrumentos o herramientas	62
8.9 Procedimiento para la recolección de datos.....	63
8.10 Extracción de ADN	63
8.11 Caracterización de <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR colonizantes.....	64
8.11.1 Secuenciación y caracterización del genoma de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	64
8.12 Consideraciones éticas	65

Análisis y resultados	66
9.1 Características microbiológicas en CHROMagar.....	66
9.2 Secuenciación de genoma completo (WGS) de <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....	66
9.3 Resistoma de aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> colonizantes de pacientes de UCI.....	68
9.4 Viruloma de aislamientos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> colonizantes de pacientes de UCI.....	72
9.5 Determinación del tipo de secuencia (ST) por WGS	73
9.6 Serotipificación de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	73
9.6.1 Serotipo O.....	73
9.6.2 Serotipo K.....	74
Discusión	75
Conclusiones	79
Glosario	80
Bibliografía.....	84

Lista de Tablas

Tabla 1. Microorganismos más comunes con resistencia a antibióticos en USA	27
Tabla 2. Variables del estudio	62
Tabla 3. Detección de género y especie por WGS	67
Tabla 4. Puntaje de resistencia	68
Tabla 5. Puntaje de virulencia	72

Lista de Gráficos

Gráfica 1. Tamaño genoma aislamientos	67
Gráfica 2. Presencia de genes intrínsecos codificantes de betalactamasas	69
Gráfica 3. Presencia de genes adquiridos codificantes de betalactamasas y carbapenemasas	69
Gráfica 4. Presencia de genes de resistencia y virulencia por aislamiento de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	71
Gráfica 5. Puntaje de virulencia y resistencia en los diferentes tipos de secuencia (ST) en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	71
Gráfica 6. Tipos de secuencias (ST) encontradas en <i>Klebsiella pneumoniae</i> – Distribución del ST (MLST).....	73
Gráfica 7. Serotipo O en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	74
Gráfica 8. Diversidad del gen <i>wzi</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	74

Lista de Ilustraciones

Ilustración 1. Linajes filogenéticos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
Ilustración 2. Países endémicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de carbapenemasas	53
Ilustración 3. Representación circular del árbol filogenético transformado (ignorando las longitudes de las ramas) generado por RAxML y dibujado usando iTOL versión 3.2.4, que muestra las relaciones genéticas entre 133 aislamientos colombianos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	55

Resumen

Introducción. La resistencia a carbapenémicos es un problema de gran magnitud en salud pública a nivel mundial, pues este grupo antibiótico se considera la última opción terapéutica para tratar este tipo de bacterias multirresistentes. La caracterización molecular de estas bacterias en pacientes colonizados brinda información que permite crear estrategias para el control de infecciones y manejo empírico más dirigido.

Objetivo. Describir las características moleculares de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos colonizantes del TGI en pacientes en UCI en dos hospitales de alta complejidad.

Materiales y métodos. Se recolectaron 29 muestras a partir de hisopados rectales de pacientes de dos hospitales de alta complejidad. La identificación del género bacteriano y del fenotipo con resistencia a carbapenémicos de estos aislamientos se estableció por medio de medios cromogénicos (ChromAgar Orientation y SuperCarba). Posteriormente, se realizó secuenciación del genoma completo por medio de la plataforma Illumina y se analizaron los datos a través de Kleborate.

Resultados. Se obtuvo un total de 19 (65%) aislamientos confirmados como *K. pneumoniae*, y se observó resistencia a tetraciclinas en un 42%. La carbapenemasa KPC fue encontrada detectada en el 16% de las cepas confirmadas y el 21% de las cepas presentó genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas. Se encontró que 31,5% de las cepas presentaron genes de virulencia relevantes como *yersiniobactina* y *colibactina*. Los tipos de secuencia encontrados fueron muy diversos y no se encontró el linaje de ST258.

Conclusión. *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos fue encontrada como colonizador del tracto gastrointestinal de pacientes de UCI, lo cual genera alerta en la probabilidad de intercambio genético con otras bacterias o la posibilidad de presentarse infecciones por este microorganismo en este tipo de pacientes. Razón muy importante para la implementación de herramientas prácticas y eficaces para

la vigilancia epidemiológica y la evaluación de rutina de la colonización por este tipo de microorganismos.

Palabras claves: *Klebsiella pneumoniae*, multidrogorresistencia, colonización, microbiota intestinal, carbapenémicos, betalactamasas, tipificación molecular, linaje, infección asociada a la atención en salud.

Abstract

Introduction: Carbapenems resistance is a huge magnitude health associate problem worldwide, cause this antibiotic group is considered the last therapeutic option for the treatment of this kind of multi-resistant bacteria. Molecular characterization of this group of bacteria in colonized patients provides information for the creation of control strategies and a efficient targeted empiric treatment.

Objective: Describe the molecular characteristics of GIT colonizing *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems in ICU patients in two highly complex hospitals.

Materials and methods: 29 rectal samples of colonized patients were collected from two highly complex hospitals. The identification of the bacteria genera and the phenotype of resistance to carbapenems of these isolates was established by means of chromogenic means (ChromAgar Orientation and SuperCarba). For the complete genome sequencing we used the Illumina platform and for the analysis of the obtained data it was used the Kleborate program.

Results: 19 confirmed isolates (65%) were from *Klebsiella pneumoniae*. 42% of the strains were resistant to tetracyclines. 16% of the strains presented the blaKPC gene and 21% of the strains presented genes for resistance to aminoglycosides and quinolones. It was found that 31.5% of the strains presented relevant virulence genes as yersiniobactina and colibactin. The sequence types found were very diverse and the ST258 lineage was not found.

Conclusion: Using the molecular typing techniques, it was possible to confirm that carbapenemic-resistant *K. pneumoniae* can colonize the gastrointestinal tract of patients upon admission to the ICU, fact which generates an alert on the probability of genetic exchange with other bacteria or the possibility of infections due to this microorganism in this type of patient. A very important reason for the implementation of practical and effective tools for epidemiological surveillance and routine evaluation of colonization by this type of microorganism.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, multidrug-resistance, colonization, intestinal microbiota, carbapenems, beta-lactamases, molecular typing, lineage, infection associated with health care.

Caracterización de la colonización por *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos en pacientes provenientes de UCI en dos hospitales de Colombia.

Introducción

Desde la aparición de los antibióticos como opción terapéutica para las infecciones, ha surgido también el fenómeno de la resistencia bacteriana, proceso que se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que realizan la acción de inhibir o matar (1). La evolución de la resistencia bacteriana ha generado bacterias resistentes a prácticamente todos los grupos farmacológicos y teniendo en cuenta, la presencia de esa resistencia a tres o más grupos se les ha denominado organismos multidrogorresistentes (MDRO) y en este trabajo se ha enfocado en poder detectar estos MDRO en pacientes que ingresan a unidades de cuidados intensivos (UCI) (2). La evolución de la resistencia bacteriana ha generado bacterias resistentes a tres o más grupos farmacológicos, las cuales denominamos bacterias multidrogorresistentes (MDRO) en el ámbito hospitalario, y en este trabajo enfocado a los pacientes que ingresan a unidad de cuidados intensivos (UCI) (2).

Los organismos que presentan multidrogoresistencia (MDRO) se han considerado como un problema de salud pública desde los años noventa principalmente por entidades internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) que en el 2015 declara un plan de acción mundial y el Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) por lo mismo se ha declarado la lucha y contención contra la resistencia bacteriana como una prioridad (3,4). *Klebsiella pneumoniae*, ha sido una bacteria oportunista aislada frecuentemente en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) que incluyen infecciones del tracto urinario, neumonía e infecciones del torrente sanguíneo que ha aumentado su incidencia en la última década y suele presentarse con resistencia a múltiples fármacos (1,5).

Teniendo en cuenta, que esta problemática ha dejado a pacientes con opciones limitadas de tratamiento y/o con ninguna de las disponibles, es cada vez más preocupante y se hace necesario realizar estudios en esta aparición de resistencia, al igual que aumenta los costos en el tratamiento de estos pacientes. Las infecciones por estos microorganismos MDRO, especialmente *Klebsiella pneumoniae*, son cada día más prevalentes debido al aumento en el número de pacientes con alteraciones inmunológicas, procedimientos diagnósticos y terapéuticos invasivos, además de las malas prácticas en el uso de los antibióticos, especialmente en instituciones hospitalarias de alta complejidad (3).

Lo que se busca con este estudio es conocer los pacientes colonizados por *Klebsiella pneumoniae* MDR en el tracto gastrointestinal e identificar determinantes de resistencia, factores de virulencia y linajes más importantes en dos hospitales de alta complejidad en Colombia para así poder determinar la prevalencia de estos pacientes ya que tienen un mayor riesgo de infección en su estancia en UCI, como un aumento de la mortalidad y son un foco clave para la transmisión de *Klebsiella pneumoniae* MDR entre pacientes (2,6) .

Planteamiento del problema

En Estados Unidos, según el CDC en el informe de 2019 ocurren más de 2,8 millones de infecciones por MDRO y de estas personas 35,000 mueren (3). Según el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) en el año 2015, las infecciones por bacterias resistentes produjeron 33,000 muertes, siendo el 63.5% de los casos derivados de la atención sanitaria (7). El grupo GREBO (Grupo para el control de la resistencia bacteriana en Bogotá) en su informe del 2017 arrojó un aumento en la resistencia por parte de *K. pneumoniae* a antibióticos del grupo carbapenémicos en adultos hospitalizados en un 23% y en UCI una resistencia del 16,5%, *E. coli* con resistencia a cefalosporinas de tercera generación de un 22% en las muestras recogidas y *E. faecium* con resistencia a vancomicina en un 34%, además se comenzó a detectar resistencia a colistina en los patógenos *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (8). Según el Instituto Nacional de Salud (INS) en el boletín epidemiológico semanal de la semana 10 de 2020, estos dos últimos patógenos toman relevancia, pues causan gran parte de los brotes asociados al cuidado de la salud en Colombia, junto con el hongo *Candida auris* (9). Los enterobacteriales resistentes a carbapenémicos (CRE) se han convertido en un problema de salud pública y en el año 2016 la OMS los añadió en patógenos prioritarios resistentes a antibióticos, siendo *Klebsiella pneumoniae* el causante del 40-60% de las infecciones causadas por CRE en Europa, Estados Unidos y China (4,10–12)

Este problema actual se ha dado por una combinación de factores ambientales, clonales y sociales (6). Estos microorganismos presentan altas tasas de infecciones asociadas a la atención en salud en instituciones hospitalarias de alta complejidad y poseen gran facilidad de diseminación debido a sus diversas formas de transmisión, lo que facilita la generación de brotes hospitalarios que trascienden incluso a otras instituciones o ciudades en un país (13). Esta problemática se incrementa en países en vía de desarrollo como el nuestro, donde adicionalmente se puede presentar comercialización de medicamentos falsificados, de baja calidad, y poca accesibilidad al sistema de salud en general, facilita

la generación de resistencia antimicrobiana y por ende la aparición de estos MDRO (6,14). Es importante resaltar que el comportamiento humano también es un factor importante para la aparición de resistencia antimicrobiana, pues se ha visto la toma indiscriminada de antibióticos sin la debida prescripción de un profesional de la salud o las indicaciones dadas por el profesional sin una causa justificada (15). Al igual que se ha encontrado una conexión importante en el uso de antibióticos en el área de veterinaria y el consumo de animales por la población consumidora de carnes (6,15). También, se ha visto que hay una mayor prevalencia de MDRO en los hospitales de tercer nivel o alta complejidad y en especial en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), aumentando la colonización según aumentan los días de hospitalización (1).

La colonización del tracto gastrointestinal es a menudo el sitio más común de infección por MDRO en los pacientes en UCI, pero también son capaces de colonizar el tracto respiratorio y la piel, que es donde el ser humano posee diferentes familias de bacterias que han venido co-evolucionando con el huésped e interviniendo en su formación y desarrollo (16). Estos microorganismos pueden ubicarse de manera transitoria o permanente en estos sitios, siendo los de modo transitorio los encargados de producir enfermedades infecciosas (16,17). Esta microbiota en individuos sanos es capaz de proporcionar funciones protectoras necesarias que no son codificadas por nuestro propio genoma, como lo es evitar la colonización de patógenos infecciosos o extraer energía adicional de los alimentos por medio de mecanismos ausentes en las células humanas (16). La microbiota intestinal consta de más de 100 billones de bacterias, que se dividen en 4 filos principales que cubren el 90% de la microbiota intestinal como son Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria (16,18). En el filo Firmicutes, se encuentran bacterias patógenas como *C. difficile* y *C. perfringens*, además de estreptococos, enterococos, y estafilococos (16). Aunque deben existir factores predisponentes para que estos microorganismos puedan producir la infección, algunos de estos son, el uso de antibióticos y otras exposiciones asociadas al ingreso de un hospital, como por ejemplo el cambio de la dieta,

puede producir un cambio en la composición, diversidad y densidad de la microbiota, propiciando un ambiente para su multiplicación y producción de toxinas (16). Los antibióticos tienen un gran impacto en el cambio de la microbiota, ya que pueden alterar las cargas bacterianas y como no tienen un blanco específico al patógeno involucrado, son capaces de eliminar bacterias comensales, modificando y produciendo más probabilidades de infección (16,19).

Aunque no solo se han encontrado MDRO en la atención hospitalaria sino en personas asintomáticas portadoras de estas “superbacterias” (20). Ser portador aumenta de un 8.8% a un 27% el riesgo de infección entre pacientes hospitalizados e ingresados en UCI, así como aumenta el riesgo de transmisión y mortalidad (20). Se han reportado tasas de 77% de colonización por parte de *Klebsiella pneumoniae* en las heces en pacientes hospitalizados, 19% en faringe y 42% en las manos (21,22). Para esto en varios países se ha propuesto la vigilancia activa, la cual consiste en detectar y controlar los MDRO y prevenir las infecciones, con protocolos estrictos de higiene entre el personal de salud (20).

En Colombia, al igual que en el resto del mundo se está viviendo esta problemática, aunque se conoce poco sobre la resistencia que podría tener *Klebsiella pneumoniae* y cuales linajes son los más colonizantes así como también estos han ido modificando su material genético para tener resistencia a múltiples grupos farmacológicos. (23)

Pregunta de investigación

¿Puede la *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos colonizar el intestino de los pacientes al momento del ingreso a UCI en dos hospitales de alta complejidad en Colombia?

Justificación

En Colombia, para el año 2006 se aisló la primera muestra de *Klebsiella pneumoniae* con una *carbapenemasa* tipo KPC, y desde esa fecha la resistencia tipo KPC ha avanzado a bacterias entéricas como *E. coli* y bacterias no entéricas como *Pseudomonas aeruginosa*, haciendo que el aumento de este tipo de resistencia catalogue a Colombia como un país endémico (24). Lo cual hace que sea imperativa la detección de MDRO para el correcto tratamiento.

En la actualidad y a consecuencia de la alta prevalencia de MDRO en UCI (1), los tratamientos iniciales brindados en los hospitales no están siendo efectivos para controlar o erradicar la infección, lo que nos conlleva a la disminución de la probabilidad de supervivencia del paciente, a un aumento los días de hospitalización comparado con los pacientes no MDRO (1) y a la limitación de la gama de medicamentos disponibles para el tratamiento del paciente (25). Entre los microorganismos multidrogosresistentes colonizadores del intestino más frecuentes tenemos: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *E. faecium* resistente a vancomicina (26).

Lo que se busca con este proyecto es analizar muestras de hisopados rectales de pacientes en UCI de dos hospitales de alta complejidad en Colombia, para así determinar qué bacterias hay presentes en el tracto intestinal (27), especialmente para *K. pneumoniae* e identificar determinantes de resistencia, factores de virulencia y linajes, lo cual va a permitir que el personal médico esté en capacidad de brindar a los pacientes ingresados en UCI un tratamiento antibiótico más efectivo y certero (27).

Tipo de estudio

Estudio transversal.

Objetivo general

Caracterizar *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos colonizantes del tracto gastrointestinal en pacientes de UCI en dos hospitales de alta complejidad

Objetivos específicos

6.1.1 Identificar los determinantes de resistencia de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos colonizantes del tracto gastrointestinal en pacientes de UCI

6.1.2 Identificar los determinantes de los factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos colonizantes del tracto gastrointestinal en pacientes de UCI

6.1.3 Identificar los linajes más importantes entre *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes.

Marco teórico

7.1 Generalidades IAAS

Las infecciones en atención en salud (HAI) por sus siglas en inglés “*healthcare-associated infection*” o en español IAAS, se definen como infecciones que ocurren después del ingreso al hospital y que no estaban en el momento del ingreso del paciente, o también se conoce como las causadas 48 horas después del ingreso y hasta 30 días después de su salida (28,29). Esta última nos aclara que el desarrollo de infecciones durante la atención médica no se limita al ámbito hospitalario, por lo que ya no se recomienda usar el término “infección nosocomial” (30). Las IAAS más frecuentes son: infección del tracto urinario asociado a catéter, infección del torrente sanguíneo asociado a vía central, neumonía asociada a ventilador, infección en sitio quirúrgico e infección por *Clostridiodes difficile* (30).

Las IAAS se pueden producir de forma endógena, es decir, hay un desequilibrio en la microbiota normal del paciente o exógena, es decir, por agentes patógenos adquiridos por la exposición en la atención médica (30,31). Estas infecciones tienen factores de riesgo multifactoriales como son la contaminación de manos en los trabajadores de la salud, equipos médicos contaminados, medio ambiente, otros pacientes ya colonizados y los mismos visitantes. Al igual, se debe analizar la capacidad de transmisión y tiempo de sobrevivencia en superficies inanimadas, capacidad de producir biopelículas y factores de virulencia y resistencia de los microorganismos implicados, conociendo también los factores de riesgo que per sé presenta el hospedero (29,30).

En el 2011 se produjeron 1,4 millones de IAAS en USA con 75,000 muertes asociadas, aunque para el 2015 disminuyó un 16% su prevalencia (32). Estas muertes se producen en mayor proporción en cuidados intensivos y se considera una de las 10 principales causas de muerte en USA (30,33). En Europa la ECDC para el año 2017 concluyó que el 8,3% de pacientes que permanecieron en cuidados

intensivos durante más de dos días presentaron al menos una IAAS adquirida en UCI bajo vigilancia (34). En América Latina se realizó en el 2016 un estudio multicéntrico-multinacional donde se recopiló información de 12 hospitales terciarios de 4 países (Brasil, Colombia, México y Venezuela) y se observó que el 10-12% de los pacientes presentaron una IAAS, un porcentaje 2 veces mayor en comparación con los porcentajes expuestos por la CDC que para el mismo año (2016) fue del 5% para la aparición de IAAS. Aunque la mayor proporción de estas infecciones están dadas por bacterias, también se pueden producir por virus (influenza) u hongos (cándida) (30).

Existe un grupo de bacterias agrupadas en el acrónimo ESCAPE donde se encuentran: *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, que fueron definidos en el 2008 (35). Se han agrupado de esta manera ya que presentan alta prevalencia en el ámbito hospitalario, así como una alta prevalencia de resistencia a los agentes antimicrobianos y la rápida diseminación en este ambiente. Por eso el acrónimo ESCAPE se consideran bacterias asociadas a la microbiota hospitalaria (36). *Klebsiella pneumoniae* se considera la tercera causa de IAAS en Estados Unidos con un 9,9%, después de *Clostridium difficile* y *Staphylococcus aureus* (37). Aunque para el 2015 un estudio realizado por Magill et. al. *K. pneumoniae* se ubica en la octava posición según su frecuencia de IAAS en Estados Unidos seguida de *Enterobacter spp* y *Pseudomonas aeruginosa* (33).

Para la disminución de estas infecciones se han dispuesto medidas preventivas en los hospitales, pues se ha demostrado que las IAAS pueden ser prevenibles de un 55% hasta un 70% tanto en sala general como en UCI (38). Es alentador ver estas cifras, pero al momento de la práctica se ha visto que los profesionales de la salud no cumplen con los protocolos de higiene que desde el 2009 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una guía de medidas que se deben tomar para disminuir la diseminación de estas bacterias, que causan infecciones en el ámbito hospitalario (4,39,40).

Estos protocolos incluyen medidas tan sencillas como “los cinco pasos de la higiene de manos” en los profesionales de la salud, al igual que la higiene que se debe tener con el paciente, como medidas de aislamiento y protocolo para pacientes con organismo resistente a múltiples fármacos. Sin dejar a un lado la higiene que se debe tener con los elementos del área hospitalaria como limpieza de quirófanos, áreas críticas y qué hacer donde se mantuvo aislado a un paciente con un MDRO (39,41,42). El protocolo para este tipo de pacientes se basa en aislamiento con tarjeta amarilla, es decir, aislamiento por contacto, el estricto lavado de manos antes y después de haber estado en contacto con el paciente, el uso de guantes, bata, lentes (en caso de riesgo a salpicadura), mantenerlo en una habitación privada si es posible, enviar la ropa de cama y batas del paciente en bolsa negra etiquetada con la leyenda “Lavado especial”, entre otros (41).

En Estados Unidos la tasa de cumplimiento del lavado de manos es menor del 50% y en algunas UCIs menor al 20%, (30,42) Otras medidas que se toman son el uso del equipo de protección personal (EPP) al estar con un paciente y no usar antibióticos cuando se considere inapropiado, refiriéndose en este caso a infecciones donde no esté indicado la administración de antibiótico. Una de la mala utilización de estos es en las bacteriurias asintomáticas, donde un estudio retrospectivo arrojó que el 64% de 94 pacientes hospitalizados, recibió tratamiento (43). Otras prácticas inapropiadas son la mala prescripción de los antibióticos con tiempos más prolongados de los establecidos o una posología inadecuada, también cuando se administra un antibiótico que tenía otra alternativa con un espectro antimicrobiano más reducido (44).

Estas infecciones son causadas la mayoría de las veces por organismos resistentes a múltiples antibióticos (MDRO), lo que hace que sean una causa importante de morbimortalidad en pacientes en todo el mundo (45). Así como también aumentan los costos de los pacientes hospitalizados y su estancia hospitalaria (45). Los MDRO más frecuentes vistos en la práctica clínica son: *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) y *Pseudomonas aeruginosa multiresistente*,

Klebsiella pneumoniae resistente a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos (KPC), *Enterococcus spp.* resistente a vancomicina (ERV) y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) (46,47). Se estima que el 8,3% de las personas que permanecen en UCI por más de 2 días, desarrollan una infección asociada al cuidado de la salud, de las cuales el 20% son ocasionadas por MDRO (5,34). En UCI podemos encontrar MDRO de dos formas: En primer lugar, pacientes positivos para MDRO al ingreso, y en segundo lugar pacientes que adquieren el MDRO en UCI, en su mayoría por transmisión paciente-paciente (46).

Se estima que en EE. UU., hay más de 2 millones de personas infectadas por MDRO, de las cuales aproximadamente 23.000 mueren a causa de estas infecciones (48,49). Para el 2017, se encontró que del total de pacientes en UCI de un hospital de EE. UU., el 58,3% de los pacientes no eran portadores de MDRO y el 41,7% eran positivos para MDRO (48).

7.2 MDRO más frecuentes

De acuerdo con la información brindada por países de diferentes partes del mundo en los últimos años, vemos que la cantidad de organismos MDRO se ha cuadruplicado en la última década (50), así mismo se aprecia que la epidemiología de los MDRO varía de acuerdo con la ubicación geográfica. (51)

En Estados Unidos, de acuerdo al National Healthcare Safety Network (NHSN) en colaboración con el Centro para Control y la Prevención de Enfermedades, desde el 2011 hasta el 2014, se recogieron datos de 4.515 hospitales en los que se reportaban infecciones por MDRO en infecciones del tracto urinario asociadas a catéter, neumonía asociada a ventilador, infecciones del torrente sanguíneo asociadas a la vía central e infecciones del sitio quirúrgico y se reportó la cantidad de microorganismos recogidos de cada tipo y el porcentaje de estos que presentaba algún tipo de resistencia, los resultados se muestran en la tabla 1 (51).

Tabla 1. Microorganismos más comunes con resistencia a antibióticos en USA

MICROORGANISMO	RESISTENCIA	PORCENTAJE
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina	50,7%
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina	82,2%
<i>Enterococcus faecalis</i>	Vancomicina	9,8%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Carbapenémicos	10,9%
<i>E. coli</i>	Cefalosporinas	22,2%
	Carbapenémicos	1,9%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenémicos	25,8%

Tomado de 2016, 37(11) Weiner et. Al (51)

En Europa, más específicamente en Alemania, de acuerdo con el Sistema de vigilancia de infecciones nosocomiales para el año 2013, se recogieron datos de 341 UCIs de 247 hospitales, los cuales reportaron 4.853 casos de *Staphylococcus aureus metilino resistente* (MRSA), 1.235 casos de *Enterococcus* resistente a Vancomicina (VRE) y 5.171 casos de bacterias Gram negativas multidrogosresistentes (MRGN). de los cuales el 16% eran Organismos resistentes a Carbapenémicos (CRO) (52).

Asia, por su parte, siempre ha tenido una gran prevalencia de MRGN, incluyendo beta lactamasas de espectro extendido (BLEEs) y CRO (52,53). En un estudio realizado en 20 hospitales en 5 países (Nueva zelanda, Filipinas, Singapur, Tailandia y Vietnam), se encontró que el 39,4% de las muestras de enterobacteriaceae eran positivos para BLEEs, y de las muestras de CRO, el 73% era *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos, 29,8% era *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos y 2,8% eran *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos (53).

En Latinoamérica, Colombia es consciente de la problemática que representa la resistencia bacteriana, por eso desde los años 90 se comenzaron a implementar acciones para su control y monitoreo (54), y a partir del 2004 el Instituto Nacional de Salud empezó la monitorización de los microorganismos resistentes de alto impacto en el ámbito comunitario (54). En Bogotá, por medio de la Secretaría Distrital de Salud, se creó el SIVIBAC (Sistema distrital de vigilancia epidemiológica de resistencia

bacteriana) (54) y por medio de la Resolución 073 de 2008 se adoptaron políticas de prevención, control y vigilancia Epidemiológica de Infecciones Intrahospitalarias para el Distrito Capital, en donde se propone un plan de sensibilización para la comunidad y las instituciones, en el que se plantean aspectos de autocuidado como el lavado de manos y el uso prudente de antibióticos por parte de las instituciones (54,55). Así mismo por medio de la normatividad, en la Resolución Distrital 0234 del 2005, Bogotá reitera la prohibición de la venta de antibióticos sin fórmula médica (56).

En el 2016, se presentaron los resultados del Programa de Vigilancia por Laboratorio de Resistencia antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS), en el que *Klebsiella pneumoniae* reporta un 37% de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en UCI y 39% en no UCI, un 15% de resistencia a carbapenémicos en UCI y 13% en no UCI. Por su parte *Escherichia coli* reporta un 26,9% de resistencia a cefalosporinas de tercera generación en UCI y 21,3% en no UCI. *Enterococcus faecium* reporta 22,3% de resistencia a Vancomicina en UCI y 25,3% en no UCI (57).

En cuanto a las bacterias Gram positivas se reporta un 31,6% de resistencia a oxacilina en UCI y 37,8% en no UCI. Por parte de los bacilos Gram negativos no fermentadores, *Acinetobacter baumannii* reporta 39% de resistencia a Meropenem en no UCI y *Pseudomona aeruginosa* reporta 31% de resistencia a carbapenémicos en UCI y 23% en no UCI (57).

7.3 Enterobacterales

El orden *Enterobacterales* es un grupo diverso de bacterias Gram negativas, anaerobias facultativas, no formadoras de esporas, en forma de bastón que miden generalmente 1 a 3 µm de largo y 0,5 µm de diámetro, dentro de la clase *Gamma proteobacterias* (58). Pueden encontrarse en aceite, agua y asociada a organismos vivos, como los humanos, siendo el tracto gastrointestinal el reservorio más predominante, así como también el tracto genitourinario y orofaringe (59). Algunos de estos

implicados en patologías en animales y seres humanos que pueden llegar a ser devastadoras como *E. coli*, *Salmonella entérica*, *Yersinia pestis*, *Dickeya*, *Pectobacterium*, *Brenneria*, *Erwinia* y *Pantoea*, son los microorganismos más frecuentemente aislados en el laboratorio y los que producen infecciones producidas en la comunidad e infecciones asociadas al cuidado de la salud (IAAS) (60). Actualmente cuenta con más de 60 géneros (58,59).

Desde 1937 esta orden se dividía en *Enterobacteriaceae* (familia), pero esto cambió en el año 2016 donde la orden *Enterobacterales* se decidió dividir en 7 familias pues se hacía difícil agrupar todos los géneros en una sola familia usando el gen 16S rRNA, por lo que recientemente se le adicionaron genes alternativos para obtener información adicional acerca de este orden taxonómico (58,61). Lo que hizo que se dividiera en estas 7 familias: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae*, *Budviciaceae* (61).

Como cualquier organismo Gram negativo estas presentan una pared celular de peptidoglicanos en el espacio periplásmico entre una membrana externa y otra interna. Las cuales son las encargadas del paso de moléculas y la fosforilación oxidativa (Membrana interna), la estabilidad osmótica (pared de peptidoglicanos). y regular el paso de moléculas hidrofílicas, al igual que prevenir la penetración de moléculas lipofílicas como detergentes y antimicrobianos hidrofóbicos por su polaridad y donde se encuentran componentes como el lípido A que es una estructura importante en el antígeno O y endotoxina importante en la virulencia (membrana externa) (59,62). Hay especies como *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter*, que presentan cápsulas de superficie que incluyen el antígeno común bacteriano, ácido colónico y una gran variedad de polisacáridos envueltos. Estas cápsulas verdaderas se unen a un LPS o fosfato de glicerol y es la base del antígeno K en el esquema de serotipado de Kauffman (59,63).

La mayoría de los miembros de *Enterobacterales* presentan flagelos, es decir, son móviles. Sin embargo, algunos no móviles presentan genes específicos para la expresión flagelar en condiciones

especiales. El proceso de biogénesis es en respuesta a una red de señales extracelulares, este está compuesto por una matriz helicoidal hueca compuesta por flagelina (59). La parte expuesta en la superficie de flagelina es altamente cambiante, dado por el resultado de diversas mutaciones y recombinaciones después de la transferencia horizontal de genes. Representado esto en el antígeno H en el esquema de serotipificación (64). Otro componente importante es el Pili o fimbrias, los cuales son producidos por delgados nanofilamentos ubicado en toda la superficie bacteriana. Su función es mediar la adhesión y autoagregación en la célula huésped, estas fimbrias son codificadas frecuentemente por plásmidos (64).

Las fimbrias más frecuentes en este orden son el tipo 1 o “chaperon-usher” que en la punta presentan proteínas de adhesión que funcionan como factores de virulencia. Otros pili encontrados en las *Enterobacteriales* son el tipo IV, los cuales son retráctiles lo que le permiten además de la adhesión le permite un tipo de locomoción llamada “twitching”, donde el pili se adhiere a una superficie y produce una retracción lo que resulta en un movimiento hacia adelante (65–67). Las toxinas que liberan este grupo de bacterias requieren una maquinaria de secreción debido a la doble membrana que presentan, algunos patotipos tienen muy bien caracterizada como *E. coli* y *Shigella* un subconjunto de proteínas autotransportadoras denominadas, autotransportadoras de serín proteasa de los Enterobacteriales (SPATE, por sus siglas en inglés), que traspasan por la membrana interna y luego por la externa gracias a la estructura de “barril” que le otorgan sus aminoácidos maduros (68).

Este gran grupo de bacterias pueden presentar 3 tipos de sistemas de secreción el tipo I, tipo II y tipo III (T1SS, T2SS, T3SS) En el tipo I se puede tomar como ejemplo las hemolisinas donde están bien estudiadas en *E. coli* las cuales son capaces de ligarse a las células huésped en un solo paso a través de la membrana interna y externa, gracias a este sistema secretor (59,69). El T2SS es un complejo multiproteico que se encuentra en el compartimiento periférico, además de secretar toxinas ayudan con la secreción de enzimas hidrolíticas (69). El sistema de secreción tipo III (T3SS) también se le

denomina “injection” puesto que su mecanismo es como el de una “aguja”, que se extiende desde la membrana celular externa y se inyecta en la membrana celular de la célula huésped (59,70).

Este extenso grupo de bacterias utilizan el hierro como un cofactor para gran variedad de procesos enzimáticos, este lo toman del huésped compitiendo con las proteínas de unión al hierro, por el factor de transcripción *fur*, que es muy ubicuo en esta orden (71). También actúan sideróforos como la enterobactina y aerobactina hacen parte de este sistema de toma de hierro considerándose esta última el factor más virulento en el caso de *Klebsiella pneumoniae* (22,71). Los patógenos que más implicación médica tienen son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Yersinia pestis*. Causando enfermedades que pueden ir desde simples problemas gastrointestinales como la diarrea del viajero producida por *E. coli* enterotoxigénica hasta infecciones asociadas al cuidado de la salud y al uso de dispositivos que pueden llevar a sepsis (34,59,60). También actúan sideróforos como la enterobactina y aerobactina hacen parte de este sistema de toma de hierro considerándose esta última el factor más virulento en el caso de *Klebsiella pneumoniae* (22,71). Los patógenos que más implicación médica tienen son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Yersinia pestis*. Causando enfermedades que pueden ir desde simples problemas gastrointestinales como la diarrea del viajero producida por *E. coli* enterotoxigénica hasta infecciones asociadas al cuidado de la salud y al uso de dispositivos que pueden llevar a sepsis (34,59,60).

7.4 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae es un patógeno oportunista que afecta con mayor frecuencia a pacientes inmunosuprimidos e IAAS (72). Es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo, fermentador de lactosa, oxidasa negativa, no motiles, en forma de bastón, aunque esta especie en las enterobacteriales es el más redondo y grueso (73). Crecen mejor en temperaturas entre 35-37 ° C y a pH 7,2, miden de

0,3 a 1,5 μm de ancho por 0,5 a 5,0 μm de largo (73). Aunque hay dos subespecies que no fermentan lactosa que son *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis* según un estudio de homología de ADN (74).

Esta subespecie se aisló por primera vez en el siglo XIX y se conoció como la bacteria de Friedlander, ya que fue quien la observó por primera vez y su nombre cambia en 1885 pues Trevisan intenta honrar de esta manera al microbiólogo alemán Edwin Klebs (74). Esta reside en el medio ambiente como en el suelo, aguas superficiales y dispositivos médicos (59). En el humano coloniza fácilmente superficies mucosas, como el tracto gastrointestinal (TGI), orofaringe, vías urinarias y sistema respiratorio, en algunos sitios esta colonización hace parte del microbiota normal del huésped (72). Puede causar enfermedades como: Abscesos hepáticos, meningitis, fascitis necrotizante, neumonía severa, bacteriemia y sepsis (75). A pesar de que las infecciones dadas por este patógeno se asocian más con sistemas inmunes comprometidos, las cepas hipervirulentas pueden afectar a pacientes sanos e inmunocompetentes (75,76). Esta bacteria tiene la capacidad de formar biopelículas en elementos médicos (Tubos endotraqueales y catéteres) (75).

El factor de virulencia más importante es la cápsula que posee, se han descrito aproximadamente 78 serotipos capsulares (antígeno K) en *K. pneumoniae* (76,77). Pero algunos serotipos como K1 y K2, en algunos artículos también consideran el K20 que son los que producen mayor hiperviscosidad (hipervirulentos), pues incrementan la producción de la cápsula de polisacáridos (CPS) al igual que una desregulación de genes reguladores mucoides como *rmpA* y *rmpA2*, que se identifica en el laboratorio por el crecimiento de colonias hipermucosas en placas de agar, así como con la técnica de la “prueba de la cuerda” que se considera positiva si se produce una cuerda viscosa >5 mm de longitud, aunque existe cierta controversia si la hiperviscosidad que se produce es dada por los CPS o por exopolisacáridos (75,78).

Esta cápsula de polisacáridos está generalmente conformada por unidades de 3 a 6 azúcares y es sintetizada por la vía de polimerización dependiente -Wzy que se encuentra bien caracterizada en *E.*

coli (75). El grupo o “clusters” de genes *cps* comúnmente consiste en genes encargados de la síntesis de estos azúcares, síntesis de unidades repetidas de la cápsula y su posterior ensamblaje y exportación (75). En la región 5´ terminal el grupo de genes *cps* contiene 5 genes conservados (*galF*, *orf2*, *wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*) y en la región 3´ contiene un gen conservado *gnd*, mientras en las regiones centrales, hay una alta diversidad (75). Tanto *wzy* y *wzi* están presentes en todos los serotipos K, aunque presentan un alto nivel de variabilidad secuencial entre los distintos tipos K (75). El gen *wzi* codifica la proteína de membrana Wzi la cual se encarga de la unión del polisacárido capsular a la membrana externa (79). El gen *wzi* es parte fundamental de la síntesis de CPS y puede ayudar a identificar de manera práctica y sencilla el serotipo K, puesto que su variación se da por la presencia o ausencia de genes en el locus *cps*.

La síntesis de la CPS inicia con el ensamblaje de unidades repetidas de azúcares individuales catalizadas por diferentes glicosiltransferasas de manera secuencial, esta cadena resultante es transferida de la membrana interna por una flipasa Wzx y luego se polimeriza por una polimerasa Wzy en el espacio periplásmico (72). Además, el control de la polimerización y exportación de la CPS madura a la superficie bacteriana ocurre por una combinación de acciones entre Wza (autokinasa de membrana interna) Wzb (proteína tirosin fosfatasa) y Wzc (Lipoproteína integradora de membrana externa) (61). El gen *magA* codifica la cápsula específica de K1, pero no juega un papel en la síntesis de la CPS y actúa en una determinación importante de virulencia (75).

Esta cápsula lo que le permite a la bacteria es generar una resistencia a la fagocitosis y opsonización de los macrófagos, neutrófilos, células epiteliales y células dendríticas (75). La *K. pneumoniae* K1 muestra una reducción significativa con la interacción de macrófagos comparado con cepas no virulentas (80). Además, si son fagocitados por neutrófilos tienen la capacidad de escapar mediante muerte intracelular mediada por neutrófilos y transportar la bacteria a distintos sitios, como el hígado, causando un absceso (75). La cápsula también tiene la capacidad de atrapar polipéptidos

antimicrobianos, por causa de concentraciones subóptimas del antimicrobiano lo que induce la expresión de genes *cps*, que protege la bacteria de la acción del fármaco (75).

Otro componente importante son los lipopolisacáridos (LPS) que intervienen en 3 partes de la bacteria: en la conservación del Lípido A hidrofóbico anclado en la membrana externa, la alta variabilidad del antígeno O, como el componente más externo de LPS y el polisacárido que conecta el Lípido A y antígeno O (81). De este antígeno O se conocen al menos 9 grupos (O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 y O12), en *K. pneumoniae*, siendo el más frecuente O1 y es también el que más hiperviscosidad produce (72,81). En un modelo murino el serotipo O1:K1 juega un papel importante para la promoción y diseminación bacteriana y colonización de órganos internos luego de iniciar la bacteriemia (81). Pero en infecciones del tracto respiratorio se determinó que el serotipo O1:K2, solo la CPS es la encargada de desarrollar la infección pulmonar, sin embargo, el antígeno O contribuye a la letalidad por el incremento de probabilidades de producir bacteriemia (72). En el tracto urinario el serotipo más asociado es O5:K57, contribuyendo a la adhesión en las células uroteliales (63,82).

El núcleo o “core” de los polisacáridos que es el encargado de unir el lípido A con el antígeno O solo cuenta con dos tipos (tipo 1 y 2) caracterizados en *K. pneumoniae*, sintetizados por dos diferentes grupos de genes *wa* (64). El tipo 2 está compuesto por *hldD*, *waaF*, *waaC*, *wabK*, *waaL*, *wabG*, *wabH*, *orf10*, *waaA*, *waaE* y *coaD* y el segundo grupo de genes *wa* difieren por solo dos genes: *wabI* y *wabJ*, que codifican el ácido 3-deoxy-D- manosa- octulosónico (Kdo) transferasa y heptosiltransferasa, que son responsables de incorporar los últimos residuos Kdo y L, D-HepI (75). El lípido A es sintetizado en el citoplasma por un conjunto de enzimas constitutivas y finalmente anclado a la membrana externa. Las modificaciones de este Lípido A contribuyen a la resistencia del sistema de defensa innato del huésped, tanto el núcleo de LPS y el Lípido A juegan un papel importante para evitar la fagocitosis por parte de macrófagos en el alveolo (75). Las fimbrias que se han encontrado son la tipo 1 y tipo 3, la tipo 1 es esencial para iniciar el establecimiento en el tracto urinario, pero no tiene efecto para

colonizar el intestino o el pulmón (82). La fimbria tipo 3 se ha visto que *in vitro* media la adhesión a células epiteliales de los tejidos renales y pulmonares, además de contribuir a la formación de la biopelícula, sin embargo, no tienen un rol en la infección en intestinos y pulmón (83). Otra fimbria que se encuentra es la Kpc que es sintetizada y ensamblada por el operón *kpcABCD*, que se asocia con una alta hipermucoviscosidad de *K. pneumoniae* que le confiere una alta actividad de formación de biopelícula (83).

La membrana externa es necesaria para complementar a la cápsula de polisacáridos y atenuar respuesta inflamatoria mediada por células epiteliales (72). La proteína que se encuentra en mayor proporción en esta membrana externa es OmpA, que previene la activación de estas células activando la vía NF- κ B- y p38 (64). Perder esta proteína hace más susceptible a la bacteria de los antimicrobianos, pero no afecta en la actividad de producción de la CPS (75). En adición, la OmpA contribuye a la resistencia de la fagocitosis por parte de los macrófagos alveolares (75). *K. pneumoniae* produce dos importantes porinas en la membrana externa (OmpK35 y 36) las cuales dejan pasar moléculas hidrofílicas como lo son nutrientes y antimicrobianos (cefalosporinas/carbapenémicos) al igual que expresa porinas alternativas, como KpnO y Omp26, con la pérdida de alguna de estas a excepción de OmpK35 aumentan la resistencia a antibióticos (72). Otro componente importante son las bombas de Eflujo AcrAB que contribuye no solo con la exportación de antibióticos sino también con agentes antimicrobianos derivados del huésped (72).

La nutrición que tienen las bacterias, en este caso *K. pneumoniae*, se basa en esencia en extraer hierro del huésped, lo realiza mediante 12 distintos sistemas de captación, que pueden ser asignados dentro de 4 grandes grupos: Transportador de hierro Feo, transportador ABC (Kfu y Sit), sistema de captación basado en hemóforos y sideróforos (islas de patogenicidad de Yersinia, *iuc* y *iroA*) (72). Las regiones de *kfu*, islas de patogenicidad, *iuc* e *iroA* se han asociado con un alto nivel de hipervirulencia (72). Estas bacterias presentan moléculas que extraen el hierro del huésped llamadas hemóforos y

sideróforos, *K. pneumoniae*, produce un sideróforo llamado enterobactina que tiene una alta afinidad por el hierro comparado con otro quelante de hierro aunque este mecanismo es inhibido por la Lipocalina 2 (75).

Sin embargo, se han encontrado en aislados de la bacteria sideróforos adicionales en infecciones del tracto respiratorio inferior como yersiniabactina (codificado *ybt* y *fyu*), salmotelina (codificada por *iroA*), aerobactina (codificada por *iucABCD*) que no son inhibidas por la lipocalina-2 lo que le permite a la bacteria poder diseminarse a diferentes sitios del huésped (72). Otro sistema de sideróforos es la colibactina, un policétido genotóxico que produce el daño de DNA de las células eucariotas, encontrado al inicio en *E. coli*, pero también se ha aislado en alrededor del 10% de cepas hipervirulentas de *Kpn* (84). Es codificado por ICE*Kp10* por el locus *clb*, se ha asociado a la colonización y diseminación en mucosas respiratoria, colonización intestinal y en el absceso hepático y se ha aislado en CG66 (100%), CG23 (80%) (84).

Últimamente ha habido un aumento en la resistencia a antibióticos por cepas derivadas de *K. pneumoniae* clásica, lo que ha causado que las infecciones que provoca este patógeno como infecciones del tracto urinario, neumonías y bacteriemias se convierten en complejos manejos por la alta tasa de resistencia a las terapias antimicrobianas (75). Aunque también se ha comenzado a observar otras cepas clínicamente importantes que son las hipervirulentas (HV) en Taiwán y sudeste de Asia como los sitios más frecuentes, causando infecciones en pacientes sanos o con factores de riesgo como el alcoholismo crónico que puede predisponer a la producción de abscesos hepáticos (75,85).

7.5 Mecanismos de resistencia a antibióticos en *Klebsiella pneumoniae*

7.5.1 Betalactámicos

Una de las maneras que *Klebsiella* y otras bacterias gramnegativas tienen para producir la resistencia a este gran grupo de fármacos es por medio de betalactamasas, las cuales lo inactivan rompiendo el enlace amida del anillo b-lactámicos, codificadas por genes bla cromosomales y genes transferibles (plásmidos, transposones). (86) Se clasifican según Ambler en A, B, C y D. Tres de estas (A, C y D) son familias de hidrolasas reactivas con la unión de serina de la estructura de la molécula de la betalactamasa. La clase B se da una reacción facilitada por la presencia de uno o dos iones de zinc en el sitio activo (87).

En la clase A las enzimas representativas son TEM y SHV, este patógeno presenta resistencia intrínseca a ampicilina pues en su núcleo genómico, se encuentra en gen *blaSHV*, que codifica para SHV y se consideran penicilinasas (87). La enzima CTX-M no solo hidroliza penicilinas, sino que también tienen la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de espectro estrecho y monobactámicos. Además, presentan la capacidad de inhibir los inhibidores de betalactamasas (tazobactam, sulbactam y clavulanato). En esta misma clase se presentan genes bla que codifican para enzimas con la capacidad de inhibir carbapenémicos, llamadas así carbapenemasas, donde aparece la KPC la más frecuente desde su descripción en 1996; estas carbapenemasas solo son susceptibles a pocos antibióticos como la colistina (88,89). El transposón y plásmidos que suelen llevar el gen *blaKPC* tienden a presentar más genes de resistencia a otros antibióticos como fluoroquinolonas y aminoglucósidos (90).

En la clase B están la metalobetalactamasas, por su capacidad de inactivar el anillo con la presencia de uno o dos iones de zinc, inhiben todos los b-lactámicos menos aztreonam (87). En esta clase están las enzimas IMP, VIM y NDM (New Delhi Metalobetalactamasa). Esta última ha surgido en las últimas dos décadas, extendiéndose con gran rapidez a nivel mundial (91). La clase C se considera

cefalosporinas, porque este grupo de antibióticos induce su expresión. La enzima más representativa es AmpC que originalmente los genes que codificaban esta enzima eran transferidos por un gen cromosomal de enterobacterias a un elemento genético lo que facilito su diseminación (92).

La clase D se encuentra el grupo OXA, cuya diseminación es mediada por plásmidos. Comprende más de 200 variantes, pero solo unas pocas presentan actividad de carbapenemasas, aunque la hidrolisis de carbapenémicos es baja comparada con otras carbapenemasas como lo son las de clase B (87,93). La OXA-48 like es la más representativa de este grupo. Además de las clases de betalactamasas, *Klebsiella pneumoniae* tiene otros mecanismos para generar resistencia, como lo son la alteración de canales llamados porinas extendidas por la membrana externa, produciendo así la disminución de la entrada de los fármacos, por lo que al entrar menos antibiótico debe incrementarse la concentración mínima inhibitoria (CIM) para conseguir el efecto deseado. Dos importantes que se mencionaron anteriormente son OmpK35 y 36, por lo cual con la pérdida de alguna de estas aumenta la resistencia (87,93).

Independientemente de la carbapenemasa que porte, se encuentra en el grupo llamado enterobacteriales resistentes a carbapenémicos (CRE) y las infecciones producidas por estos patógenos multirresistentes hacen que haya una limitada opción de antimicrobianos lo que conlleva a unas altas tasas de morbimortalidad en comparación con bacterias no resistentes (72).

7.5.2 Quinolonas

Las quinolonas son otro grupo de fármacos que son frecuentemente utilizados para infecciones donde se involucran gérmenes gramnegativos. Se han descrito varios mecanismos de resistencia como lo son la acumulación de mutaciones de genes que codifican la ADN girasa y la topoisomerasa IV diana de las quinolonas, disminución de la concentración intracelular por la inhibición o mutación de porinas y bombas de exclusión (OqxAB) y la adquisición de genes de resistencia mediada por elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones(94). Normalmente un solo mecanismos no genera

una notable resistencia, por lo que deben aparecer varios de estos para conferir la resistencia a aminoglucósidos (95). Los genes plasmídicos *qnr* generan una hidrólisis de las quinolonas por la proteína *acc* (6') *Ib-cr*, lo que le da protección a la ADN girasa y topoisomerasa IV (94). Se han encontrado más de 100 variantes del gen *qnr* y se han agrupado en 5 familias (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS*). Se ha visto que este gen se encuentra en el mismo plásmido o transposón donde se genera resistencia a beta lactámicos a enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae* BLEE (95,96).

Otra resistencia es dada por las mutaciones de la zona *quinolone resistance- determining region* (QRDR) de la ADN girasa donde están los genes *gyrA* y *gyrB* y genes de la topoisomerasa IV *parC* y *parE*. (95)

7.5.3 Aminoglucósidos

Como los mecanismos de resistencia anteriormente mencionados, la resistencia a aminoglucósidos se puede dar por modificaciones enzimáticas en el fármaco, modificación de la diana ribosómica y la disminución de la entrada del antibiótico al espacio intracelular por alteraciones en la permeabilidad como lo son las bombas de exclusión y las porinas (97). El mecanismo más común es la producción de enzimas modificadores de aminoglucósidos, lo que produce la modificación del ARNr 16s y esto conlleva a una reducción en la unión del fármaco a su sitio diana, generando un alto nivel de resistencia. Actualmente se han identificado siete genes de metilasa de ARNr 16S (*ArmA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *npmA*) (97). Pero para que esta resistencia se exprese se deben encontrar los 3 mecanismos por los que se confiere resistencia, al igual que la resistencia de quinolonas. El mecanismo menos común es la alteración de la diana 16S ribosómica (97).

7.5.4 Polimixinas (Colistina)

El mecanismo de resistencia a este antibiótico ha surgido recientemente, lo que preocupa al sector de la salud ya que la colistina se considera como la última línea de manejo para tratar infecciones complicadas causadas por gérmenes gramnegativos (98,99). El mecanismo de acción de este fármaco

es producir un cambio en la electrostática de la membrana de la bacteria, lo que genera un desequilibrio y por consiguiente la muerte celular (98). La bacteria es capaz de reducir esta atracción electrostática inicial por la disminución de cargas negativas de la membrana externa por medio de la modificación del lípido A, por medio de un sistema de dos componentes PhoP-PhoQ (98,99).

7.5.5 Macrólidos

Este grupo de antibióticos está más dirigido para el tratamiento de infecciones de organismos grampositivos como cocos grampositivos, cocos gramnegativos y bacilos intracelulares, ya que las bacterias gramnegativas expresan genes intrínsecos para la formación de bombas de exclusión que ayudan con la salida de este medicamento produciendo una disminución del antibiótico en el intersticio de la bacteria, aunque en el caso de la shigelosis en niños suele utilizarse la azitromicina para el tratamiento de esta patología gastrointestinal porque alcanza concentraciones altas en el colon y así ayuda a inhibir a la *Shigella* (100,101). En este grupo tenemos a la claritromicina, azitromicina y espiramicina, que son los más utilizados en nuestro país actualmente (101). La resistencia a estos fármacos se puede dar por la modificación o metilación del sitio diana el cual es el ribosoma, salida del fármaco o inactivación. En los patógenos grampositivos se encuentran genes *erm* que codifican enzimas para la metilación ribosómica lo que disminuye la unión del macrólido con el ribosoma (101). En los enterobacteriales se ha encontrado un gen *mphA* transmitido por plásmidos que codifica una fosfotransferasa 2' que le confiere resistencia a azitromicina, lo que los hace reservorios de estos genes de resistencia que pueden transferirse a otros organismos patógenos como *Shigella* que puedan producir infecciones intestinales graves (shigelosis)(100,102). Otro mecanismo de resistencia es con la adquisición de bombas de exclusión con la presencia de los genes *mefA* y *msrA*, normalmente encontrados en Gram positivos pero se ha visto *mefA* en bacterias Gram negativas(102,103).

7.5.7 Tetraciclinas

La resistencia a este grupo antibiótico está dada por gran variedad de mecanismos entre los que encontramos proteínas de protección ribosomal (RPP) como tet(M), tet(O), tet(S), tet(W), tet(32), and tet(36), tetB(P), otr(A), tet, tet(Q) y tet(T), genes de inactivación enzimática como tet(X) y tet(37), genes mosaico como tet(O/W), tet(O/W/O), tet(O/32/O) y tet(O/W/32/W/O) y bombas de eflujo, las cuales hacen parte de la superfamilia de facilitadores principales, las cuales son proteínas de membrana que atraviesan la bicapa lipídica y fueron clasificadas en 7 grupos, las más prevalentes clínicamente son las del grupo 1, que se caracterizan por ser anti-portadoras de fármaco-H⁺ (104), a este grupo pertenecen Tet(A) y Tet(B) las bombas de eflujo más frecuentes en Gram negativos, así mismo a este grupo pertenecen Tet(C), Tet(D), Tet(E), Tet(G), Tet(H), Tet(J), Tet(Y), Tet(Z). En Cuanto al grupo 2 encontramos Tet(K) y Tet(L), en los grupos 3 a 7 se encuentran bombas menos importantes clínicamente (104,105).

7.5.8 Trimetoprim y Sulfonamidas

Estos dos grupos de antibióticos se suelen dar en combinación con el fármaco trimetoprim/sulfametoxazol pues generan sinergia entre sí, ya que inhiben la formación del ácido fólico bacteriano inhibiendo las enzimas dihidropteroato sintasa (DHPS) y la dihidrofolato reductasa (DHFR), respectivamente (106). Este antibiótico posee un amplio espectro bacteriano entre esas la familia de *enterobacterales* aunque *Proteus mirabilis* y *Enterobacter* presentan menos susceptibilidad al fármaco, también tiene acción contra *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* en infecciones del tracto respiratorio (107). Los mecanismos de resistencia a este fármaco pueden ser transferibles por elementos genéticos móviles, estos mecanismos pueden ser modificaciones en las bombas de salida, en inhibición de porinas, mutaciones en las enzimas diana y resistencia adquirida a las enzimas diana resistentes a fármacos (107). La resistencia de trimetoprim se da por el cambio de

un aminoácido en el gen *dhfr* que codifica a la enzima DHFR cromosómicamente alterada, este cambio se ve más asociado a gérmenes gramnegativos y se ha identificado más de 20 genes transferibles de *dhfr* (106,107).

La resistencia trasmisible a las sulfonamidas esta mediada a partir de dos genes *sul1* y *sul2*, que producen cambios conformacionales en la estructura de la enzima DHPS, no se conoce el origen de estos genes y frecuentemente están relacionados la resistencia de trimetoprim y sulfonamidas. El gen *sul1* se encuentra relacionado con más genes de resistencia transferibles en los transposones de la familia Tn21 (106,107).

7.5.9 Rifamicinas

Las rifamicinas son un grupo de antibióticos donde el más conocido y utilizado es la rifampicina, la cual se utiliza para el tratamiento de la tuberculosis y las enfermedades meningococcicas, tienen una gran actividad contra Gram positivas y algunas Gram negativas (108). Su mecanismo de acción se da inhibiendo la ARN polimerasa bacteriana, se ha visto que ha surgido una gran preocupación por el aumento de resistencia por parte de *Mycobacterium tuberculosis*, estas mutaciones están dadas en el gen *rpoB*, sin embargo, se ha visto la aparición de otro gen que se ha identificado en especies diferentes a *Mycobacterium* transmitido de manera horizontal (108,109). Este gen es el *arr* que codifica a ADP ribosiltransferasa una enzima responsable de la inactivación del fármaco. Los *arr-2* y *arr-3* se han visto asociados a genes de integrones clase 1 en cepas de bacterias gramnegativas como *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* (110). En la clínica no presenta gran relevancia, pero son cepas potencialmente transportadoras de genes de resistencia que pueden ser transferidos horizontalmente a gérmenes patógenos causantes de infecciones en el ser humano (109,110).

7.6 Complejos clonales en *K. pneumoniae* y su diseminación

En *K. pneumoniae* hay un núcleo genómico que se encuentra presente en más del 95% de los aislados y se estima que comprende ~2000 genes, en cambio los genes que varían entre esta especie se

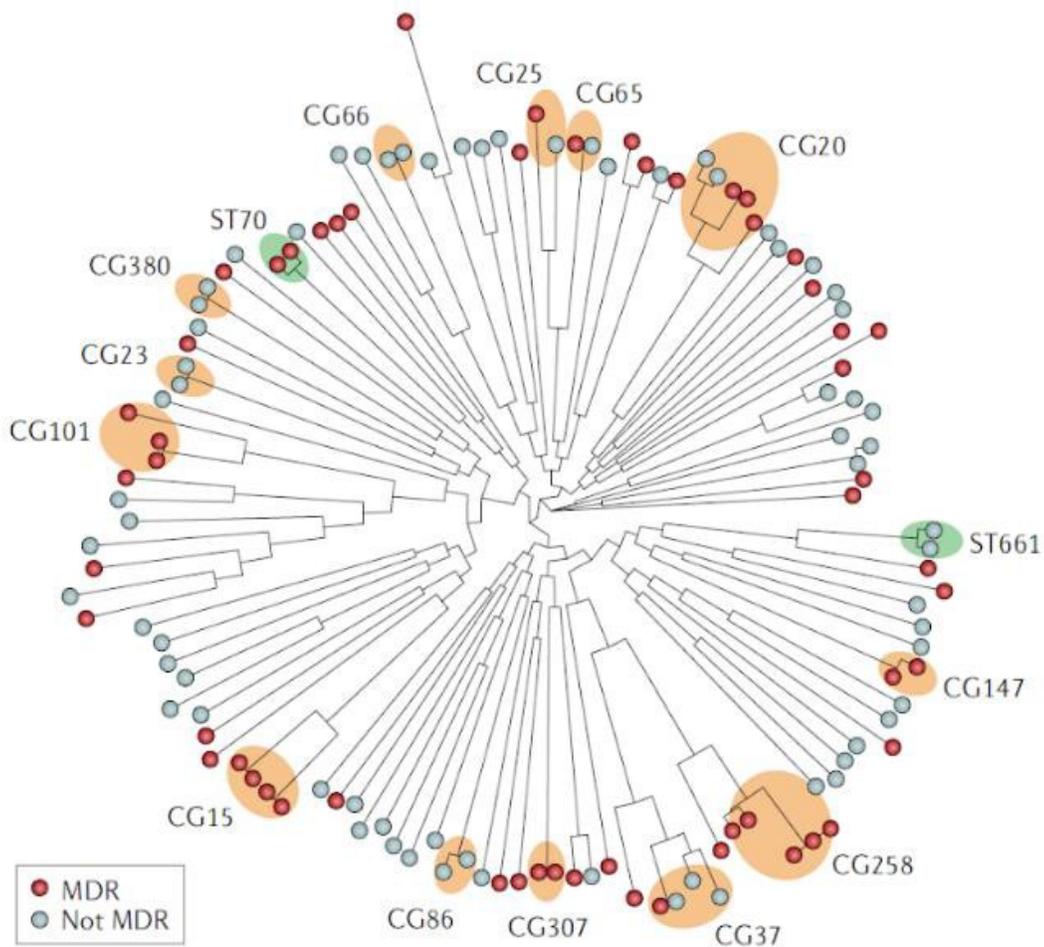
denomina genoma accesorio que incluye los genes codificados en el cromosoma o en elementos móviles, como plásmidos (84). Este genoma presenta entre 5000 y 6000 genes y pueden ser identificados usando secuencias repetitivas basadas en PCR (rep-PCR), electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), y tipificación multilocus de secuencias (MLST) que es la técnica utilizada más comúnmente (84,111). El núcleo genómico mantiene un linaje entre especies que puede tener una divergencia de nucleótidos de $\sim 0,5\%$, a este se le conoce como complejo clonal (CG, por sus siglas en inglés “clonal group”) (84).

Son definidos por la tipificación de secuencia multilocus del núcleo genómico (cgMLST), que es un esquema de clasificación y nomenclatura basado en la variación de secuencia de nucleótidos en genes centrales o genes de mantenimiento donde se utilizan fragmentos de cada gen entre 450 a 500 pares de base y se le asigna un número particular de alelo a cada secuencia única que se encuentre en un gen de mantenimiento de la especie (84). Este linaje o grupos clonales son etiquetados o basados en el tipo de secuencia multilocus de siete genes dominantes (84).

Las cepas se clasifican según sus tipos de secuencias (ST) que se definen por estos siete genes conservados (*mdh*, *infB*, *tonB*, *gapA*, *phoE*, *pgi*, *rpoB*) Los complejos clonales (CC) o grupos clonales (CG) describen subpoblaciones de *K. pneumoniae* que presentan un ancestro en común por estos genes conservados (72,111). Hay un total de 157 linajes reportados basados en el análisis del genoma completo de 289 genomas de *Kp* y 155 complejos clonales definidos en la base de datos de cgMLST (<https://www.cgmlst.org/ncs/schema/2187931/>) (112). Las infecciones por este patógeno son causadas por diversos clones que están distribuidos globalmente, pero los CG varían su prevalencia entre países (84). La mayoría de estos clones producen infecciones limitadas, sin embargo, hay un subconjunto con un linaje altamente resistente donde encontramos a los tipos de resistencia de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y resistente a carbapenémicos que se han convertido en un problema mundial (84).

Los grupos clonales como el CG258, CG15, CG20, CG29, CG37, CG147, CG101 y CG307 no están relacionados entre sí, pero se han asociado a causantes comunes de multidrogorresistencia en infecciones asociadas al cuidado de la salud (figura 1). En la Figura 1, también se puede observar los CG que se asocian más a *Kpn* hipervirulenta (CG23, CG66, CG380, CG65, CG85) y los que se han asociados a MDR (CG258, CG307, CG29, CG16, CG147), por consiguiente, en estos “clonal group” podrán determinarse factores de hipervirulencia como los serotipos K1 (asociado a CG23) y K2, al igual que otros sistemas sideróforos que se mencionaron anteriormente como la yersiniabactina y colibactina y otros factores de virulencia (75,84).

Ilustración 1. Linajes filogenéticos de *Klebsiella pneumoniae*



Tomado de 2020, 18(6) Wyres et. al (113)

Una secuencia tipo de *Klebsiella pneumoniae*, ST258 y CG258, es la que se ha distribuido en todo el mundo en los últimos 15 años (114). Surgió de una recombinación de ST11 un miembro de CG258 y una cepa de ST442 (20% del genoma es derivado de ST442 y el 80% es homólogo a ST11) (72). Además esta cepa lleva un elemento conjugativo integrado (ICE), que también presenta la cepa ST11, lo que sugiere que este ICE se recombinó en la porción ST442 (72). Teniendo en cuenta esto, se puede observar que las cepas de *K. pneumoniae* tienen una alta variabilidad de someterse a recombinaciones genéticas con otras cepas, además de darse de manera rápida y adquirir nuevos rasgos (72). Aunque, estos rasgos que les permiten sobrevivir y causar infección varía entre cepa y cepa (72).

Se ha asociado no muy claramente que la propagación de esta cepa a nivel mundial se puede deber a factores codificados por ICEK.p258.2 que se están encontrando y fuertemente relacionado con tipos de secuencia, como ST11 (115). Específicamente codifica un pili tipo IV que facilita la persistencia y el cambio de información genética. Aunque ST258 está bien distribuida por todo el mundo, se ha visto que presenta menos niveles de virulencia y más sensibilidad a la fagocitosis por parte de los macrófagos compara con la cepa ST439, pero tienen una mayor resistencia a la unión con neutrófilos y es la que se asocia con transportar mecanismos de resistencia contra fármacos (72,84).

La cepa ST258 a pesar de que se puede encontrar asociada con presencias de KPC, no se correlaciona con la actividad de virulencia (72). Los mecanismos de resistencia encontrados en *K. pneumoniae*, sin ser exclusivo de esta, pues se extiende a la mayoría de las bacterias Gram negativas, presentan 4 clases de carbapenemasas (clase A-D), donde las KPC son clase A, dependientes de serina (10–12). Hay 24 tipos de variantes de KPC clase A aunque las más estudiadas son la KPC-2 y KPC-3 (72). En ST258 son codificadas por Tn4401 un transposón Tn-3, ha sido encontrado en diferentes tipos de plásmidos de ST258 y pueden transferirse con gran facilidad a otras cepas de *K. pneumoniae* (72). En adición, se puede generar resistencia por carbapenemasas de clase B o también llamadas metalo- β -lactamasas

que son dependientes de Zn^{+2} , como la NMD-1 y clase D donde se encuentran las OXAs, en caso de *K pneumoniae* la OXA-48 es la más encontrada (85). Los mecanismos de resistencia encontrados en *K. pneumoniae*, sin ser exclusivo de esta, pues se extiende a la mayoría de las bacterias Gram negativas, presentan 4 clases de carbapenemasas (clase A-D), donde las KPC son clase A, dependientes de serina (10–12). Hay 24 tipos de variantes de KPC clase A aunque las más estudiadas son la KPC-2 y KPC-3 (72). En ST258 son codificadas por Tn4401 un transposón Tn-3, ha sido encontrado en diferentes tipos de plásmidos de ST258 y pueden transferirse con gran facilidad a otras cepas de *K. pneumoniae* (72). En adición, se puede generar resistencia por carbapenemasas de clase B o también llamadas metalo- β - lactamasas que son dependientes de Zn^{+2} , como la NMD-1 y clase D donde se encuentran las OXAs, en caso de *K pneumoniae* la OXA-48 es la más encontrada (85).

7.7 *Klebsiella pneumoniae* asociada a IAAS e Infección en UCI

Klebsiella pneumoniae es una de las causas más frecuentes de infecciones asociadas al cuidado de la salud (IAAS), responsable principalmente de infecciones en tracto urinario, respiratorio y bacteriemias que la ha hecho considerarse un problema de salud pública (40). Se pueden encontrar con cepas clásicas y cepas hipervirulentas (HV), según un estudio chino el 56% de cepas clásicas presentaban BLEE mientras que solo el 17% lo presentaba en las cepas HV, aunque se debe considerar que las infecciones producidas por cepas HV tienen un pronóstico menor comparado con las de cepas clásicas, al igual que estas cepas HV son causantes de infecciones tanto en ámbito hospitalario como en la comunidad, lo que significa que pueden infectar a pacientes sanos, produciendo infecciones como abscesos hepáticos (principalmente en Asia), ITUs, meningitis y neumonía asociada a la comunidad pero son más susceptibles a la acción de los antibióticos (84,116,117). *K. pneumoniae* es una de las causas principales de IAAS con un 11.8%, pueden ocurrir en pacientes ventilados o no ventilados y causa hasta el 12% en neumonías asociadas al cuidado de la salud sin uso de ventilación (72).

Un dato importante es la causa de infecciones en la comunidad por este patógeno que del 22 al 32% de los casos requieren una admisión en el área de cuidados intensivos, con rangos de mortalidad de un 45% a un 72% (118). El alto riesgo de mortalidad en UCI se produce por los factores de riesgo que presenta el paciente al ingreso y durante la estadía:

- > 65 años
- Presentar una neoplasia
- Neumonía asociada al cuidado de la salud
- Requerir ventilación mecánica
- Requerir catéteres urinarios.
- Uso de antimicrobianos de espectro extendido (Cefalosporinas de tercera y cuarta generación, tigeciclina y carbapenémicos) durante la estadía.

Pues lo que causa es una disbiosis entre la microbiota intestinal y un crecimiento del orden clostridiales, enterobacterales, enterococos, estafilococos y *Candida*, con una disminución de bacteroidales, fusobacteriales y verrucomicrobiales que tienen un rol de protección en la microbiota (explicado más adelante) y procesos invasivos o cirugías en pacientes que no eran portadores al inicio de la estadía (118,119). Una estadía en UCI mayor a 3 semanas se observó que más del 50% de pacientes presentaban cepas resistentes y un factor clave para la aceleración del riesgo fue la administración de antibióticos, según este estudio (118).

Las infecciones pulmonares causadas por *Kpn* incluyen neumonía nosocomial y asociada a ventilador (NAV), neumonía adquirida en la comunidad (NAC), infección secundaria en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), absceso pulmonar y empiema (82). La neumonía asociada a ventilador causada por *Klebsiella pneumoniae* se encuentra entre un 9-12% de los patógenos aislados según un estudio realizado en Estados Unidos y 9 países de Europa y el fenotipo

de resistencia más aislado en *Kpn* fue betalactamasas de espectro extendido (BLEE) con un 20% en Estados Unidos y 35% en Europa (120). Es el tercer patógeno más frecuente seguido de *Pseudomonas aeruginosas* para producir neumonía asociada al cuidado de la salud y la clínica cursa con infiltrados alveolares, fiebre, tos, incremento en la producción de esputo y leucocitosis (120). En el absceso pulmonar es poco común que sea causado por *Klebsiella pneumoniae*, pero en un estudio retrospectivo de 1995 a 2003 realizado en Taiwán encontró que el 25% de los aislados eran *Klebsiella pneumoniae* y se asoció más a pacientes con diabetes mellitus (119).

La bacteriemia se define como la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo en pacientes con signos y síntomas de infección, los pacientes que presentan bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* tienen una alta mortalidad del 16 al 40% (121). Existen factores de riesgo como trasplante de órganos, enfermedad hepática crónica, hemodiálisis, malignidad y sepsis que pueden aumentar esta mortalidad y la infección primaria que más se asocia son las causadas en el tracto biliar o genitourinario (122).

Es frecuente que se aísle en infecciones del tracto genitourinario aunque menos frecuente que *Escherichia coli* (123). En el ámbito hospitalario las infecciones del tracto urinario están asociadas a la utilización de catéteres (CAUTI, por sus siglas en inglés “catheter associated urinary tract infection) y no asociada a estos (no CAUTI) (123). Un factor de riesgo que se ha asociado a la producción de CAUTI son los pacientes con diabetes mellitus y aquellos que tienen una estancia en UCI más prolongada se asociaron con una elevada mortalidad, así como también aquellos con una duración prolongada de la utilización del catéter (121,122).

Un estudio retrospectivo, unicéntrico realizado en un hospital de tercer nivel en la ciudad de Córdoba, Argentina demostró que *Klebsiella* es el segundo patógeno más frecuente aislado en pacientes en UCI con infecciones del tracto urinario sin catéter y con catéter siendo este último más alta la incidencia (14% vs 25%) donde el 36,5% de *Kpn* fue productora de BLEE (124). También se observó una

resistencia a imipenem en pacientes que habían tenido una estancia en UCI comparados con los pacientes que habían estado en sala general (124).

Otra patología que se asocia frecuentemente a *Klebsiella pneumoniae* es el absceso hepático piógeno, a pesar de ser una entidad polimicrobiana subyacente con una patología hepatobiliar o colangitis (125). El cuadro clínico es fiebre y dolor abdominal asociado a síntomas comunes e inespecíficos como náuseas, vómito, anorexia, pérdida de peso y malestar (126). Los signos generalmente son hepatomegalia, sensibilidad al rebote, dolor a la palpación en cuadrante superior derecho o ictericia. Algunos factores de riesgo son: presentar una enfermedad hepatobiliar pancreática subyacente, trasplante de hígado, peritonitis, cáncer colorrectal y el uso de inhibidores de las bombas de protones y como se ha mencionado en patologías anteriores la diabetes mellitus (126). Es importante destacar que esta patología cuando es causada por *Klebsiella pneumoniae* se denomina, síndrome invasivo de absceso hepático causado por *Klebsiella pneumoniae* y se presenta con mayor frecuencia en Asia, especialmente en Taiwán y es adquirida comúnmente en la comunidad por cepas de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulentas (hvKP), como lo muestra un estudio realizado en Taiwán donde una serie de 248 pacientes con absceso hepático piógeno el 69% fue causado por *Kpn* (127).

Siguiendo con las infecciones abdominales, este patógeno también puede producir peritonitis bacteriana espontánea, definida como una infección del líquido ascítico dentro de la cavidad intra-abdominal en ausencia de cualquier fuente de infección quirúrgicamente tratable y que ocurre casi siempre en pacientes con cirrosis y ascitis (89). Más del 60% son gramnegativos de la flora entérica, siendo *E. coli* el más común (~70%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* con una incidencia del 10% (128).

En el sistema nervioso es común que pueda causar meningitis o absceso cerebral en el ámbito hospitalario, según un estudio realizado en Estados Unidos ($n=151$ casos) el 8,6% fueron causadas por *Klebsiella pneumoniae* y la neurocirugía fue el factor de riesgo más importante para la producción

de meningitis nosocomial (129). Pero es raro que esta se encuentre aislada en meningitis adquirida en la comunidad y cuando esto ocurre se asocia con una complicación metastásica de una infección primaria de absceso hepático, según un estudio realizado en Taiwán y también se ha visto en adultos mayores de forma espontánea o primaria que tienen un compromiso de su sistema inmune (129). Otras infecciones que se puede aislar este patógeno es endoftalmitis, absceso esplénico, absceso profundo de cuello, fascitis necrotizante, infección espinal, artritis séptica, pericarditis purulenta, piomiositis y aneurisma micótico. Todas estas se han asociado con mayor incidencia en países asiáticos como Taiwán y donde la prevalencia de cepas hvKP es mayor que en el resto del mundo (130).

Se ha visto que los pacientes ingresan a UCI como portadores de cepas con múltiple resistencia, en china un estudio realizado a 234 pacientes determinó que el 15% presentaba esta resistencia el primer día del ingreso a UCI (12,72). *Klebsiella pneumoniae* es conocido como un colonizador asintomático de la piel, boca, tracto respiratorio e intestinal, se ha detectado en el 10% del proyecto del microbioma humano de la boca y nariz y en un 3,8% de muestras de heces (2,74). Al ingreso de las unidades de cuidados intensivos se ha aislado a estos pacientes portadores que tienen un riesgo mayor de desarrollar infecciones por este patógeno, en un estudio realizado ($n=498$) donde se tomaron muestras de heces a pacientes al ingreso a UCI, el 10% ($n=49$) resultaron positivo para *Klebsiella pneumoniae* siendo la infección más frecuente neumonía (2). De este grupo el 16% ($n=8$) desarrollaron una infección con una incidencia más elevada de que esta infección se asociara con *Kpn* MDR ($n= 5$) en comparación con el 3% ($n=12$) del grupo que no portaban la bacteria al momento del ingreso (2).

Se encontró que *Klebsiella spp.* OXA-48 pueden persistir en el ámbito hospitalario hasta 20 meses, en comparación con *A. baumannii* que solo son 4 meses o *C. difficile* que tiene un máximo de tiempo de 5 meses (131).

7.8 Epidemiología de *Klebsiella pneumoniae*

La incidencia de *Klebsiella pneumoniae* ha ido en aumento en las últimas dos décadas directamente proporcional con su capacidad de generar resistencia a fármacos (75). Hablando de *Klebsiella* productora de carbapenemasas, de las 4 clases de betalactamasas propuestas por Ambler (A-D) la clase A con la enzima KPC, dependiente de serina, es la más frecuentemente asociada con *K. pneumoniae*, siendo KPC-2 y KPC-3 las que se han diseminado por todo el mundo (Fig. 2) que sólo son susceptibles a pocos fármacos como colistina, tigeciclina y aminoglucósidos (93). De la clase B, las cuales son betalactamasas dependientes de la unión de uno o dos iones de Zinc (metal) para producir su acción, la más relevante clínicamente y de reciente aparición, pues se aisló por primera vez en 2008 en pacientes que regresaban de un viaje de la India a Suecia ha sido NDM (Nueva Delhi Metalo betalactamasa) (93). Desde esta aparición se ha esparcido por gran parte de los países y se ha aislado esporádicamente en países como Colombia, Estados Unidos, Canadá, Grecia, entre otros pero su zona endémica sigue siendo India y Pakistán (Fig 2) (132). De la clase D, la más frecuente aislada en países como España, Francia, Egipto, Libia y Turquía es OXA-48 (Fig. 2) (93). Aunque no es muy frecuente que se encuentre asociado betalactamasas de clase C a *Klebsiella* se ha reportado cuatro enzimas (ACT-1, CMY-2, CMY-10, ADC-68). Estas son resistentes a penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y no son susceptibles a inhibidores antiguos de betalactamasas (93). Se ha visto que suelen estar asociadas con defectos en la permeabilidad de la membrana o aumento de las bombas de exclusión para presentar resistencia a carbapenémicos (132).

En Bogotá del 2010-2018 se ha visto que la resistencia de *Kpn* a ceftazidima se ha mantenido constante, en cambio la resistencia a carbapenémicos ha comenzado a aumentar de manera considerable tanto en UCI como en hospitalización general en adultos, según el boletín No. 11 del grupo GREBO. Fue la segunda bacteria más aislada tanto en UCI como en hospitalización por debajo de *E. coli* (133). En UCI el perfil de resistencia que se encontró en mayor porcentaje fue la ampicilina

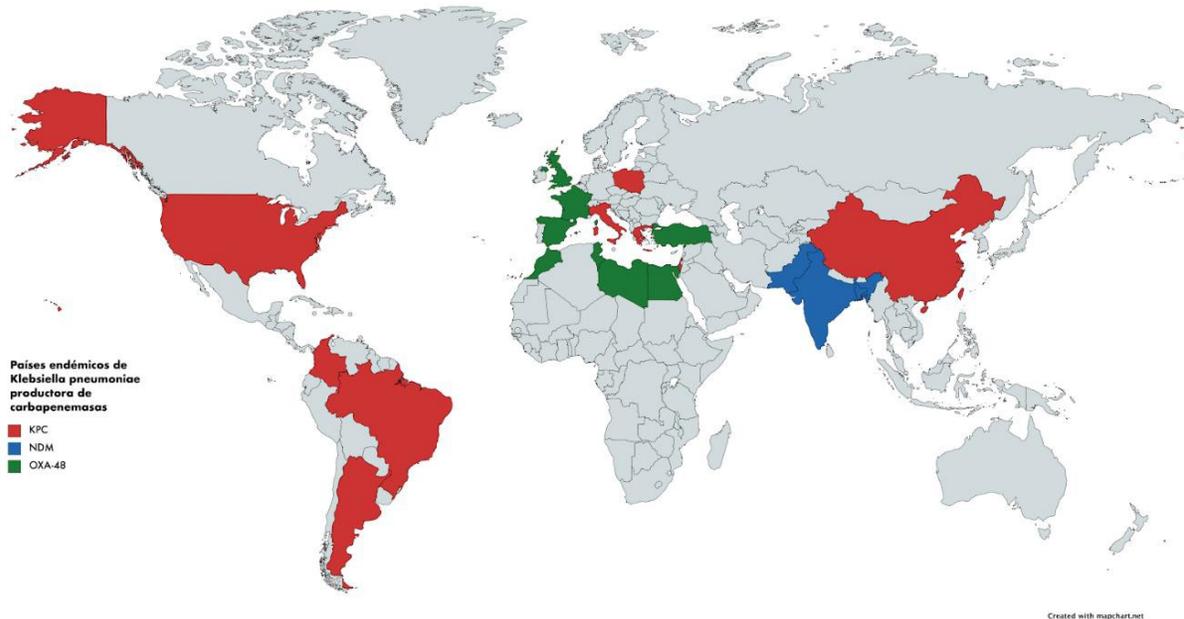
sulbactam con un 40% de los aislados, seguida de un 32% de resistencia a ceftazidima y ceftriaxona. La resistencia a carbapenémicos fue de alrededor del 17% en comparación con el año 2010 que se había encontrado en ~7% (133). Pone en clara evidencia el surgimiento de este tipo de resistencia en unidad de cuidados intensivos.

Las KPC más relevantes y con mayor patogenicidad son KPC-2 y KPC-3, distribuidas a nivel mundial siendo más frecuente la KPC-2 en Estados Unidos, Europa y China y la KPC-3 y KPC-2 en América latina (111). Estas beta-lactamasas están presentes en más de 100 tipos de secuencia, pero se han encontrado principalmente en ST258, ST11, ST15 que también se han distribuido de manera rápida y exponencial. Aproximadamente el 70% de estas KPC se han identificado en ST258 que es el tipo de secuencia más predominante en estados unidos y el 90% de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* en Israel (84).

En china el que presenta mayor prevalencia es ST11 y en Latinoamérica es ST258, acompañado de países como Europa y medio oriente (11,12). Aunque en un estudio publicado en el 2018 que recopiló 133 aislados clínicos de 24 hospitales de 10 principales ciudades de Colombia de 2002-2014, se encontró que solo el 43% de las muestras estudiadas pertenecían al CG258 y se asoció con KPC-3, mientras que los no-CG258 se asociaron con KPC-2 (Fig. 3) (133).

Ilustración 2. Países endémicos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas.

KPC (rojo), NDM (azul), OXA-48 (verde) (93)



Adaptada de 2016, 7(895) Lee C (93)

El primer caso de *K. pneumoniae* que expresa carbapenemasas se identificó en Carolina del norte en 1996 y se denominó KPC (72). Desde este primer reporte, a la fecha, se han identificado aislados productores de KPC en Europa, Asia, Medio Oriente, América Central y del Sur, África y Oceanía (72). En Latinoamérica la primera KPC fue aislada en la ciudad de Medellín, Colombia en el año 2005 en dos hospitales donde se aislaron 2 pacientes con KPC-2 que se encontraba en un transposón *Tn4401b* que estaba integrado a un plásmido IncF13, que ha sido el plásmido más frecuentemente reportado con el gen *bla_{KPC}* (134).

Sin embargo, suele verse en un mismo plásmido varios genes de resistencia asociados, en el caso de Colombia KPC-2/VIM-24 (135). El primer paciente con KPC en Colombia presentó neumonía con bacteriemia que lo llevó a la muerte y esta bacteria se aisló en sangre, líquido ascítico y cultivo de orina (134). El segundo paciente cursaba con una infección de vías urinarias que resolvió con terapia y la muestra donde se aisló la cepa fue de orina. Posterior a esto, en el 2008 en un paciente proveniente

Ibagué se presentó un paciente con *K. pneumoniae* que expresaba KPC-3 pero este gen estaba en el transposón *Tn4401b*, que se asoció más con la diseminación de KPC-3 en Colombia (136). También se observó que esta cepa que circulaba anteriormente en el país manejaba más cantidad de factores de virulencia en donde se encontró Fimbria tipo III, *mrk*, yersiniabactina, *irp*, *ybt*, *fyu* y colibactina (136). Mientras que la cepa aislada en el israelí sólo contenía el grupo de genes que codifica para la Fimbria tipo III (136). Se ha pensado entonces con estos hallazgos que el origen de KPC-3 en Colombia puede provenir de Nueva York, Estados Unidos ya que en el plásmido Inc12 donde estaba contenida es 98% similar a los plásmidos circundantes en esa ciudad (136). La combinación de estos dos mecanismos (cepas de Israel y la cepa que circula en Colombia) puede provocar una “perfecta tormenta”, como lo nombra el artículo, de una masiva epidemia de carbapenemasas producidas por bacterias gramnegativas (136).

Además se ha encontrado KPC en bacterias diferentes a *Kpn* como en *Salmonella typhi* o *Pseudomonas aeruginosas* (24,134). La primera bacteria donde se aisló KPC después de *K. pneumoniae* fue en *Pseudomonas aeruginosas* en el 2009, contenida en el plásmido PCOL-1 muy similar a IncP6, aislado en *Kpn* (137). Vale la pena destacar que la enzima KPC-2 es la que suele transmitirse entre especies por elementos genéticos móviles (EGM) y transferencia horizontal y KPC-3 se disemina por transferencia clonal, aislándose exclusivamente en *Klebsiella pneumoniae*, no se conoce aún el mecanismo de este suceso (136). Aunque no ha sido la única enzima aislada pues, desde entonces han aparecido carbapenemasas adicionales como MLB, NDM-1, IMP, VIM en cepas de *K. pneumoniae* (72). Las cepas HV de *K. pneumoniae* es raro que se encuentren asociado a resistencia, pero presentan un mayor grado de virulencia, en Asia se encontró unas cepas hipervirulentas asociadas a resistencia resultando en una tasa de mortalidad del 84% (138).

Hablando ahora de beta-lactamasas se sabe que las más frecuentes que se aíslan no solo en *Klebsiella pneumoniae* son SHV y TEM y desde hace dos décadas ha aparecido CTX-M, hay que aclarar que *K.*

pneumoniae presenta resistencia intrínseca a ampicilina pues lleva en su core genómico la beta-lactamasa de clase A, SHV. La enzima que se ha encontrado con mayor frecuencia es CTX-M 15, en un estudio realizado en un hospital de la India donde se aisló en un 92% de las cepas de *Kpn* y en otro estudio de cohortes donde se analizaron muestras de *Kpn* en sala general se aisló en el 100% de las muestras, las cuales son resistentes a ceftazidima y cefotaxima. Los tipos de secuencia más asociados fueron ST170 (26%), ST405 (26%) y ST392 (23%) en las muestras de infecciones adquiridas en el hospital (139,140).

En el 2013 la CDC informó que las cepas productoras de BLEE causaron el 23% de IAAS por *Klebsiella pneumoniae*, equivale a 17 000 infecciones y provocaron 1 100 muertes (141) En Colombia más del 71% de *Klebsiella pneumoniae* presenta mecanismo de resistencia tipo BLEE y en Europa la detección nosocomial de *Kpn* BLEE fue del 30%, dos veces mayor que las encontradas en *E. coli* (142). Por otra parte, *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, causó 11% de las IAAS, lo que equivale a 7 900 infecciones y 520 muertes (141). Para el 2015 las muertes causadas por *K. pneumoniae* y *E. coli* se estimaron de 2 118 y 141 respectivamente en Estados Unidos y Europa (138).

7.9 Microbioma humano

El microbioma humano se refiere a la comunidad de microorganismos asociados a un hospedador, en este caso humano, junto con sus elementos genéticos, metabolitos e interacciones que establecen en el entorno que los rodea (epigenética) (143–145). Este término contiene al término microbiota, el cual hace referencia al conjunto de microorganismos (incluyendo Bacteria, Archaea, Eukarya, hongos y virus). que habitan en el cuerpo humano (145), los cuales son fundamentales para el funcionamiento de varios órganos y pueden ser mutualistas, comensales o patógenos (144), se calcula que cada adulto sano hospeda de 1.000.000 a 10.000.000 de genes microbianos y que el número total de células microbianas en el microbiota humano es hasta 10 veces mayor del número de células humanas (145).

El microbioma varía de persona en persona y depende de factores como la edad, alimentación, carga genética, tipo de parto, trabajo, infecciones previas, medicamentos, contacto con otras personas, cambios hormonales, etc., así mismo varía de órgano en órgano, por lo que en nuestro cuerpo tenemos diferentes tipos de microbioma de acuerdo con el órgano o sistema en que se encuentren. El microbioma más amplio es el del tracto gastrointestinal, pero también tenemos otros microbiomas en tracto genitourinario, piel, sistema respiratorio, cavidad oral y nasofaríngea (146).

Entre las principales funciones de la microbiota tenemos: Endocrinas, modificación de la densidad mineral ósea, señalización neurológica, maduración del sistema inmune y regulación de este en la piel, síntesis de aminoácidos, inhibición de patógenos, síntesis de vitaminas (K, B12 y folato), recirculación y metabolismo de sales biliares y la modulación de algunos fármacos, además de una amplia cantidad de funciones en el tracto gastrointestinal (147).

El tracto gastrointestinal tiene una gran cantidad de microorganismos que forman un complejo ecosistema con variadas y múltiples funciones. La diversidad de este microbioma depende de factores como la dieta, medicamentos, ubicación geográfica, edad, tipo de gestación, tipo de alimentación en la infancia y estrés (metabólico y/o psicológico) (145).

La colonización y adquisición de flora bacteriana comienza desde la etapa fetal en el útero, estudios recientes han mostrado la presencia de microorganismos en la placenta, cordón umbilical y líquido amniótico, responsables de las primeras colonizaciones en el ser humano. Así mismo se ha encontrado presencia de entre 1 a 5 microorganismos en el meconio, los cuales varían de acuerdo con la edad del feto al momento del parto, entre los microorganismos aislados en el meconio se encontraron *E. fecalis*, *S. epidermidis* y *E. coli* en mayor proporción (148).

Al nacer, el feto recoge más microorganismos, los cuales van a variar de acuerdo con el tipo de parto. En el caso de parto vaginal, el feto puede adquirir diferentes tipos de microorganismos de acuerdo

con la edad de la mamá, la presencia o ausencia de patologías endógenas genitales, el antecedente de infecciones vaginales, etc. Los microorganismos más frecuentes son: *Lactobacillus spp*, *Corynebacterium spp*, *Staphylococcus epidermidis* y *estreptococos* (18,149), los cuales se albergan en el tracto digestivo (150).

En la etapa de la lactancia el feto recoge microorganismos de 2 formas: La primera por el contacto con la piel de la mama, y la segunda por transmisión a través de la leche materna, la cual contiene más de 600 diferentes tipos de bacterias. Los microorganismos más frecuentemente encontrados son los miembros del género *Bifidobacterium*, que alcanzan hasta el 90% (150,151). y son las responsables de aumentar la producción de IgA, la cual se encuentra involucrada en la modulación del sistema inmune intestinal. En menor concentración encontramos a los *Lactobacillus* (150).

En el caso de que el bebe sea alimentado con leche de fórmula los microorganismos mayormente encontrados son bacteroides, enterococos, coliformes y clostridios (152). Después de estas etapas la microbiota intestinal va a cambiar de acuerdo con los factores ya vistos anteriormente.

El microbioma intestinal de un adulto contiene más de 1.000 especies de microorganismos (153), la gran mayoría anaerobios. Existen 2 filotipos bacterianos predominantes: *Firmicutes*, que representan entre el 10% y 25% (contienen a los *Lactobacillus* y *Clostridiodes*). y *Bacteroidetes* (contienen *Bacteroides* y al *Prevotella*), que representan entre el 65% y 90% (154,155).

Entre los géneros bacterianos subdominantes encontramos las *Enterobacterales* (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, etc.). con un 0,7% (156), y otros como *Actinobacterias*, *Verrucomicrobias*, *Fusobacterium*, *Proteobacterias*, *Cyanobacterias*, *Spirochaetes*, hongos, arqueas, virus y demás microorganismos (154,155).

El tracto gastrointestinal está compuesto por 3 estructuras: Estómago, Intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y colon, cada una con microbiomas diferentes que varían de acuerdo con el pH,

peristaltismo, propiedades de adhesión bacteriana, secreción de mucina (contiene inmunoglobulinas IgA), disponibilidad de nutrientes, dieta, antagonismo bacteriano, etc (155). De acuerdo con estos factores, en el estómago y duodeno encontramos una población pequeña de bacterias (10^1 a 10^3 CFU/ml), debido al ácido clorhídrico y a las sales biliares (155), entre las cuales están: *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.* y la levadura (152).

Más abajo en yeyuno e íleon, encontramos una densidad bacteriana de 10^4 y 10^7 CFU/ml (155), con bacterias como: *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacteroides*, *Enterobacteriaceae*, *Bifidobacterium spp.* y *Fusobacterium spp.* (152). Finalmente en colon la cantidad de bacterias llega a 10^{11} y 10^{12} (155), con la siguiente población bacteriana: *B* (152).

La microbiota del colon tiene 3 funciones principales:

1. Nutrición y metabolismo: Se realiza la fermentación de sustratos no digeridos y del moco endógeno (producido por el epitelio intestinal), se produce vitamina K y B12, se absorbe Calcio, Hierro y Magnesio, se fermentan los carbohidratos de la fibra para producir 3 ácidos grasos de cadena corta: Acetato para los miocitos, Butirato para los enterocitos y Propionato para los hepatocitos, producidos principalmente por las Firmicutes (147,155,156). Además, ayuda a la regulación del almacenamiento de la grasa corporal y la lipogénesis (147)
2. Protección: Crea un efecto de barrera que impide la invasión de microorganismos patógenos (156).
3. Efectos tróficos: Ayuda al desarrollo del sistema inmune y actúa sobre la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal (156).

La microbiota intestinal es parte fundamental de los estados de salud y enfermedad del portador, ella contribuye al mantenimiento de la homeostasis intestinal gracias a la relación simbiótica de esta con el tracto gastrointestinal, por lo que una alteración de ella ocasionada por alguno de los factores ya

expuestos puede contribuir en la patogénesis de varias enfermedades (157,158). Tal es el caso de los cánceres del tracto gastrointestinal (esófago, gástrico, colorrectal, Hepático y pancreático) (157).

Metodología

8.1 Tipo de estudio

Estudio transversal

8.2 Evento

Paciente de UCI con cultivo positivo en hisopado rectal para *Klebsiella pneumoniae*

8.3 Población y selección de participantes

La población de referencia está constituida por los aislamientos obtenidos de los hisopados rectales recolectados de los pacientes mayores de 18 años admitidos en UCI de 2 hospitales de alta complejidad de Colombia

8.4 Criterios de inclusión

- Cultivo positivo para *Klebsiella pneumoniae* en hisopados rectales.

8.5 Criterios de exclusión

- Cultivo positivo para bacterias diferentes a *Klebsiella pneumoniae* en hisopados rectales.
- Pacientes a quienes no se les haya realizado el hisopado rectal al ingreso a UCI.

8.6 Instituciones participantes

En el estudio participan dos hospitales de alta complejidad de Colombia

- Organización Clínica General del Norte - Barranquilla
- Hospital Universitario San Jorge de Pereira - Pereira

8.7 Variables de estudio

A continuación, se exponen las variables de estudio las cuales se tendrán en cuenta en la selección de los datos expuestos en los resultados.

Tabla 2. Variables del estudio

Variable	Definición operativa	Tipo
Colonización por <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Paciente quien ingresa a UCI y que al realizarle un frotis rectal el cultivo microbiológico final sale positivo o no para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cualitativa nominal
Género	Conjunto de comportamientos y valores asociados de manera arbitraria, en función del sexo.	Cualitativa nominal
Edad	Tiempo en años transcurrido entre la fecha de nacimiento y la fecha de ingreso al estudio.	Cuantitativa continua
Procedencia	Tipo de institución o residencia de la cual proviene el paciente	Cualitativa nominal
Manejo antibiótico profiláctico	Terapia antibiótica profiláctica administrada al paciente	Cualitativa nominal
Dosis	Dosis antibiótica administrada al paciente por vía endovenosa.	Cualitativa nominal
Duración de tratamiento profiláctico	Número de dosis desde el inicio del esquema antibiótico hasta su suspensión.	Cuantitativa continua
Perfil de resistencia de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	De acuerdo con las MIC (CLSI), sensibilidad del microorganismo aislado del paciente	Cualitativa nominal
Factores de riesgo para MDRO	Presencia de algún factor que aumente el riesgo de infección por gérmenes multidrogresistentes.	Cualitativo nominal

8.8 Instrumentos o herramientas

Se realizó un hisopado rectal para la obtención de las muestras clínicas, posteriormente para la identificación de los microorganismos presentes en las muestras se utilizó el medio CHROMagar Orientation y SuperCarba (159,160). Para la extracción del DNA se utilizó el kit QIAamp Stool DNA Mini Kit (Qiagen). Para la secuenciación de los fragmentos de DNA se utilizó la plataforma Illumina (161).

8.9 Procedimiento para la recolección de datos

El personal técnico de cada hospital recibió un entrenamiento por parte del investigador principal y la coordinación clínica hospitalaria antes del inicio del estudio.

En ambas instituciones de Salud, la recolección de los datos y las muestras será realizada por personal técnico debidamente entrenado en un formato de recolección de datos con temporalidad prospectiva. Una vez es ubicado el posible candidato en UCI, se procede a solicitar autorización al médico tratante para contactar al paciente o a su acudiente legal. El personal invitará al paciente o a su acudiente legal a participar del estudio y en caso de aceptar se procederá con la firma del consentimiento informado y la inclusión del paciente en el estudio. Ya cuando el paciente es incluido en el estudio se procede con el diligenciamiento del formato de recolección de datos y se pedirá al personal encargado realizar el hisopado rectal, de acuerdo a las normas de bioseguridad. Este es un procedimiento sencillo que no representa riesgo alguno para la mucosa rectal del paciente y solo causará una leve incomodidad. La muestra obtenida será transportada en un medio de transporte AMIES a través del courier autorizado (Fedex) a las instalaciones del Laboratorio UGRA de la Universidad El Bosque. En UGRA se realizarán los procedimientos microbiológicos por medio de medios cromogénicos (ChromAgar Orientation y SuperCarba) para la detección de la resistencia a carbapenémicos (159,160). Luego, se realizará la secuenciación de genoma completo por la plataforma Illumina, donde se determinará el resistoma, viruloma y el tipo de secuencia (ST).

8.10 Extracción de ADN

Se realizará con un kit QIAamp Stool DNA Mini Kit (Qiagen), la verificación de la calidad de la muestra se realizará por absorbancia, fluorometría y electroforesis en gel de agarosa.

8.11 Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* MDR colonizantes

8.11.1 Secuenciación y caracterización del genoma de *Klebsiella pneumoniae*

El ADN genómico se extrajo de los aislamientos bacterianos a partir de cultivos en caldo, utilizando el kit comercial DNeasy (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante (overnight, extracción de ADN y elución ADNg), posteriormente se verificó la calidad del ADN obtenido, evaluando su pureza, integridad y concentración mediante el uso de electroforesis en gel de agarosa. Se prepararon las librerías de secuenciación genómica utilizando el kit de preparación de muestras de ADN NexteraXT de Illumina, siguiendo los protocolos del fabricante. Las librerías obtenidas fueron verificadas y normalizadas utilizando Qubit® 2.0 (Invitrogen Life Technologies) y bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies).

La secuenciación del ADN se realizó utilizando la tecnología Illumina empleando el secuenciador MiSeq, esta tecnología de secuenciación es de las conocidas como de secuenciación de próxima generación masiva (NGS) o por sus siglas en inglés “*Next Generation Sequencing*”.

Las muestras obtenidas se filtraron por calidad utilizando Trimmomatic (162), usando valores por defecto para secuenciación Illumina. Posteriormente fueron utilizadas para realizar ensamblajes *de novo* de los genomas de cada uno de los aislamientos utilizando el programa SPAdes (163). Los genomas serán anotados utilizando RAST. La especie será confirmada usando bases de datos de referencia KmerFinder (164), StrainSeeker Species (165) y SpeciesFinder (166). Se realizará tipificación molecular de los aislamientos mediante la determinación de su Multi Locus Sequence Type (MLST) basados en los esquemas disponibles en la base de datos PubMLST (<https://pubmlst.org>) utilizando las herramientas del Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>) (167). La detección de determinantes genéticos de resistencia, mutaciones y virulencia se realizará mediante búsquedas contra bases de datos de referencia ResFinder (168) y Virulence Finder Database utilizando BLAST seleccionando los hits

obtenidos de acuerdo con criterios en porcentaje de identidad (mayor a 95%) y cobertura (mayor a 80%) con las secuencias de referencia. Además, para conocer información más organizada se utilizó el programa Kleborate que permite extraer de manera rápida información del genotipo de *Klebsiella pneumoniae*. <https://www.nature.com/articles/s41467-021-24448-3>

8.12 Consideraciones éticas

De acuerdo con la regulación definida en la resolución 8430 del ministerio de salud de Colombia en el año 1993, este estudio es clasificado de riesgo mínimo ya que es un estudio prospectivo que emplea el registro de datos a través de procedimientos comunes como son, la toma de cultivos microbiológicos frente a la sospecha clínica de infección, rastreos de pacientes colonizados por bacterias MDRO y obtención de información a través de la historia clínica y el reporte de los cultivos. Este estudio no realizará ninguna intervención o modificación intencional de las variables biológicas, fisiológicas o psicosociales de la población donde las muestras fueron tomadas.

Este estudio ya fue aprobado por el comité institucional de ética de la Universidad El Bosque y es financiado por el Ministerio de Ciencias (Código 130880764152).

Todos los pacientes y/o acudientes legales estuvieron de acuerdo con el procedimiento y firmaron el consentimiento informado.

Análisis y resultados

9.1 Características microbiológicas en CHROMagar

Al realizar las siembras de las diferentes muestras (n=29) en CHROMagar Orientation se obtuvieron a las 24 horas de incubación colonias de mediano tamaño, de color azul en diferentes tonalidades, algunas de ellas con consistencia viscosa, además se observaron colonias de tamaño mediano a grande, de rosado oscuro a rosa más claro y transparentes (169). Teniendo en cuenta que este medio es un medio no selectivo para la identificación de patógenos, el crecimiento de colonias de color azul puede ser del grupo *Klebsiella- Enterobacter - Serratia* (KES) (ref). Luego de tomar las colonias se realizó un nuevo proceso de sembrado en el medio cromogenico CHROMagar SuperCarba, el cual es un medio para la identificación de enterobacteriales resistentes a carbapenémicos. A las 24 horas de incubación a una temperatura de 37,5°C se obtuvieron colonias de tamaño mediano de coloración azul metálico (160).

9.2 Secuenciación de genoma completo (WGS) de *Klebsiella pneumoniae*

Por medio de WGS se obtuvo la confirmación de género y especie, encontrando que 19 aislamientos (65,51%) correspondieron a *Klebsiella pneumoniae*, 4 aislamientos (13,79%) a *Klebsiella variicola*, 3 aislamientos (10,34%) correspondieron a *Klebsiella quasipneumoniae*, 1 aislamiento (3,44%) correspondió a *Enterobacter cloacae*, 1 aislamiento (3,44%) correspondió a *Enterobacter asburiae* y 1 aislamiento (3,44%) correspondió a *Enterobacter hormaechei*.

La presencia de estos *Enterobacter* puede deberse principalmente a 2 motivos, uno de ellos es la posible contaminación de la muestra y el otro es la presencia de perfiles plasmídicos similares entre estas cepas, otra explicación es que al momento de la recolección de los cultivos en los medios cromogenicos al no ser selectivo de *Klebsiella* se haya tomado una de color azul metálico que no correspondiera a *Klebsiella spp.* y fuera *Enterobacter spp.* (159,170).

De este modo para el análisis final, solo se tuvieron en cuenta las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, por lo que se tomó analizó un total de 19 (65,51%) muestras.

9.3 Resistoma de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* colonizantes de pacientes de UCI

Se realizó la búsqueda de genes de resistencia en los genomas de *K. pneumoniae* donde se incluyen BLEE, carbapenemasas y carbapenemasas asociadas a resistencia a colistina. Con la ayuda de kleborate se decide dar un puntaje a los factores de resistencia presentes en el genoma donde los más relevantes y la combinación de ellos darán diferentes puntajes, se entiende que un mayor puntaje arroja una resistencia más elevada para la cepa en estudio (ver puntaje en tabla 4).

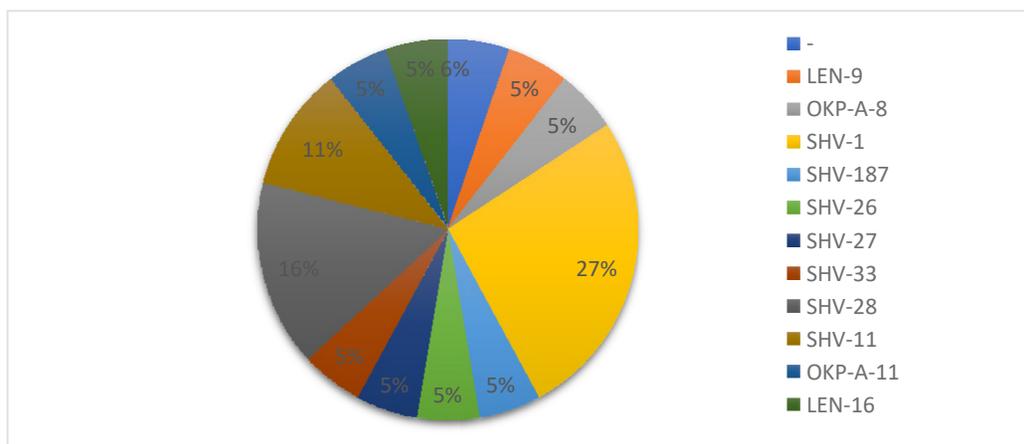
Tabla 4. Puntaje de resistencia

1	BLEE
2	Carbapenemasas
3	Carbapenemasas y gen asociado con resistencia a colistina
0	Otra

Tomado de 2021, 12(1) Lam M A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex

Como se mencionó anteriormente, *Klebsiella pneumoniae* presenta resistencia intrínseca a penicilinas ya que produce cromosómicamente la enzima SHV (172), en nuestra investigación se encontró que de los 19 aislamientos recuperados 18 de ellos presentan genes cromosomales de betalactamasas, cuya frecuencia se expone en la gráfica 3, es importante mencionar que la más frecuente fue SHV-1 (27%, n:5) la cual es una de las enzimas más conservadas cromosómica y constitutivamente en *Klebsiella pneumoniae* (172,173).

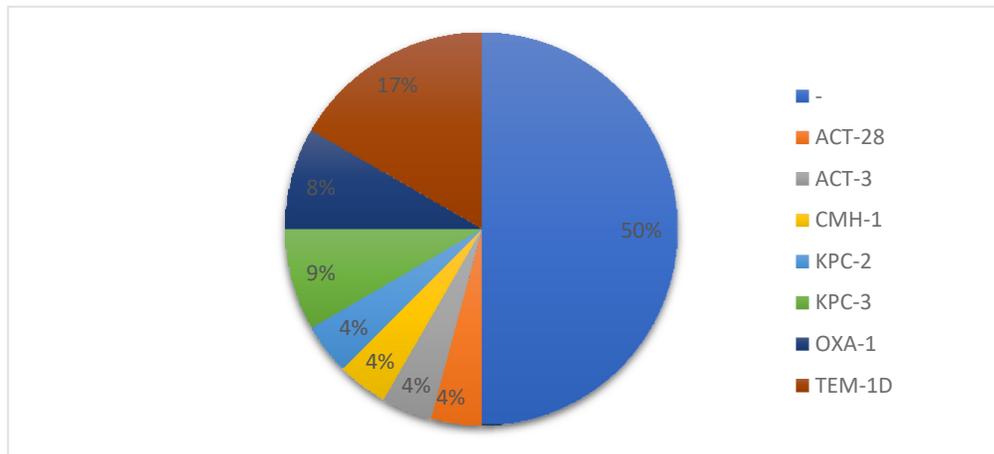
Gráfica 2. Presencia de genes intrínsecos codificantes de betalactamasas



Autoría propia

Con respecto a las demás betalactamasas como vemos en la Gráfica 3, se encuentran presentes en el 36,84% de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, de los cuales de acuerdo a la clasificación Ambler: De la clase D, encontramos a *OXA-1* (n:2) quien confiere resistencia a ampicilina y cefalotina (174), de la clase A encontramos a *TEM-ID* (n:4) la cual es la betalactamasa más frecuentemente encontrada en Gram negativos y confiere resistencia principalmente a ampicilina y penicilina (175), así mismo de la clase A encontramos las carbapenemasas en 3 aislamientos de los cuales *KPC-2* se encontró en un 33,3% (n:1) y *KPC-3* en un 66,6% (n:2), de la clase C encontramos a *CMH-1* (n:1), *ACT-3* (*AmpC* type β -lactamase) (n:1) y *ACT-28* (n:1), las cuales son cefalosporinas no inhibibles por clavulanato (176).

Gráfica 3. Presencia de genes adquiridos codificantes de betalactamasas y carbapenemasas.

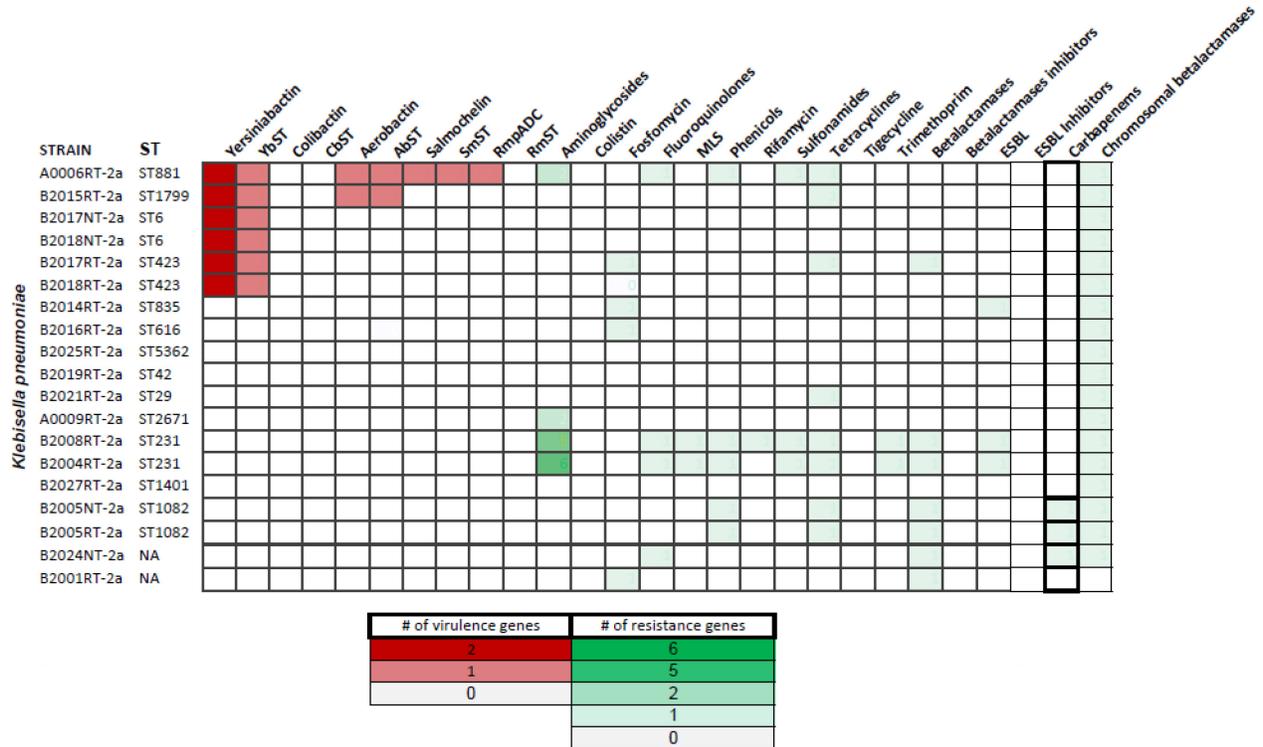


Autoría propia

Se observa que el 21,05% (n:4) de los aislamientos posee genes de resistencia a aminoglucósidos entre los que encontramos los genes *aac(3)-IIa*, *aac(6)-Ib-cr*, *aadA2*, *aadA*, *strA*, *strB*, en donde los genes *strA* y *strB*, se encontraron en el 100% de aislamientos portantes de genes de resistencia para este grupo antibiótico. La presencia de genes de resistencia a fosfomicina se encontró en el 21,05% (n:4) de los aislamientos, entre los que encontramos los genes *fosA*: *fosA3*, *fosA7* y en mayor proporción *fosA2* (50%). Los genes de resistencia a fluoroquinolonas se encuentran en el 21,05% (n:4) de los aislamientos, en donde el gen *qnrB1* se encontró en 2 aislamientos, otros genes de resistencia a fluoroquinolonas que encontramos son: *qnrB19* y *qnrE1*. Con respecto al grupo antibiótico MLS_B (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas B) solo se presentó un gen de resistencia: *mphA*, en 2 aislamientos. Los genes de resistencia a fenicoles se encuentran presentes en el 26,31% (n:5) de los aislamientos, de los cuales el gen *catA1* representa el 40% y los genes *floR*, *catB3*, *catB4* un 20%, respectivamente. El gen de resistencia a rifampicina *arr-3* se encuentra presente en tan solo en 1 aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* correspondiendo con un 5,26%. Los genes de resistencia a sulfonamidas se encuentran en el 15,78% de los aislamientos, entre los que encontramos los genes *sul-1* (40%) y *sul-2* (60%). La presencia de genes de resistencia a tetraciclinas se encuentra en el 42,10% de los aislamientos, el gen mayormente expresado es *tet(A)* con un 55,5% (n:5), seguido de

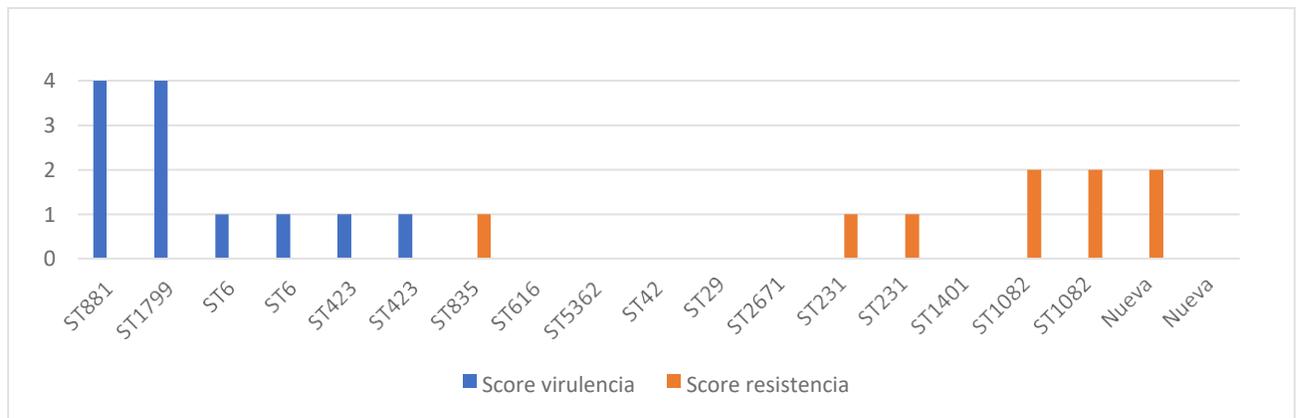
tet(D) con un 45,5% (n:4). Finalmente, los genes de resistencia a Trimetoprim se encuentran tan solo en 2 aislamientos, en donde los genes que encontramos son: *dfrA12* (n:2) y *dfrA14* (n:1).

Gráfica 4. Presencia de genes de resistencia y virulencia por aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*



Autoria propia

Gráfica 5. Puntaje de virulencia y resistencia en los diferentes tipos de secuencia (ST) en *Klebsiella pneumoniae*



Autoria propia

De las 19 especies de *K. pneumoniae*, 12 de ellas tuvieron ≥ 1 punto en virulencia o resistencia. 6 cepas presentaron un puntaje ≥ 1 en virulencia y 6 en resistencia, dentro de estos un nuevo ST presento un puntaje de virulencia. Ningún ST tuvo puntaje de resistencia y virulencia.

9.4 Viruloma de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* colonizantes de pacientes de UCI

Se realizó la búsqueda de genes de virulencia en los genomas de *K. pneumoniae* donde se incluyen los sideróforos y los reguladores del fenotipo mucoide (*rmpACD*, *rmpA*). Con la ayuda de kleborate se decide dar un puntaje a los factores de virulencia presentes en el genoma donde los más relevantes y la combinación de ellos darán diferentes puntajes, se entiende que un mayor puntaje arroja una virulencia más elevada para la cepa en estudio. En este puntaje no se tiene en cuenta Salmochelina ya que su presencia esta muy asociada con los genes de aerobactina. Esta puntuacion lo que busca es generar una jerarquía general de la virulencia (Margaret).

Tabla 5. Puntaje de factores de virulencia en *Klebsiella pneumoniae*

0	No presenta yersiniobactina, colibactina o aerobactina
1	Solo yersiniobactina
2	Yersiniobactina y colibactina o solo colibactina
3	Aerobactina sin yersiniabactina o colibactina
4	Aerobactina con yersiniobactina
5	Yersiniobactina, colibactina y aerobactina

Tomado de 2021, 12(1) Lam M A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex

Se entiende que son tomados estos factores de virulencia encargados del transporte de hierro por su papel importante para el mantenimiento y supervivencia de la bacteria en el huésped. Realizando este puntaje a los genomas secuenciados podríamos afirmar que 31,5% de las cepas presentaron 1 o más de 1 punto en el puntaje de virulencia, 2 de las muestras son las más virulentas, una de ellas con un puntaje de cuatro y 4 de ellas con un puntaje de uno. Los tipos de secuencias asociados a estas altas virulencias fueron ST23, ST1799, ST881. Además, la cepa más virulenta (A0006RT-2a) presentó un gen de *rmpADC*, el cual es uno de los genes implicados en la hipermucosidad e hipervirulencia de *K.*

pneumoniae. Yersiniobactina fue el sideróforo con genes más encontrados en las cepas que presentaron genes de virulencia. No se encontraron genes de Colibactina en las cepas estudiadas (Ver grafica 4).

9.5 Determinación del tipo de secuencia (ST) por WGS

De las cepas secuenciadas se les realizó la búsqueda de 7 genes conservados en la especie de *K. pneumoniae* (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*). El tipo de secuencia (ST) está dada por la variación alélica donde se encuentra cada uno de los 7 genes conservados. Se encontró que 2 (10,5%) de las muestras recolectadas presentan una variación alélica no documentada en bases de datos actualmente por lo que son ST nuevos. Dos de las cepas presentaron ST231 (10,5%), 2 cepas ST423 (10,5%), 2 cepas ST6 (10,5%) y 2 cepas ST1082 (10,5%). Las 8 muestras restantes (47,36%) presentaron tipos de secuencias diferentes (ST1401, ST1799, ST2671, ST29, ST42, ST616, ST835, ST881), como se muestra en la gráfica 5.

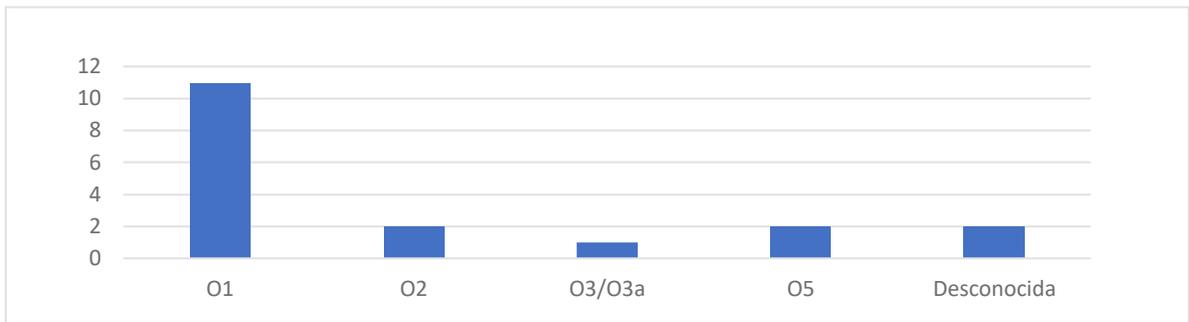
Gráfica 6. Tipos de secuencias (ST) encontradas en *Klebsiella pneumoniae* por MLST



9.6 Serotipificación de *Klebsiella pneumoniae*

9.6.1 Serotipo O

En *Klebsiella pneumoniae*, se evidenció que más del 50% de la especie tiene el serotipo O1 en su LPS, el cual es uno de los más frecuentes según la literatura y el que más hipermucosidad genera. Se encontraron 2 cepas con antígeno O desconocido, ver grafica 7.

Gráfica 7. Serotipo O en *Klebsiella pneumoniae*.

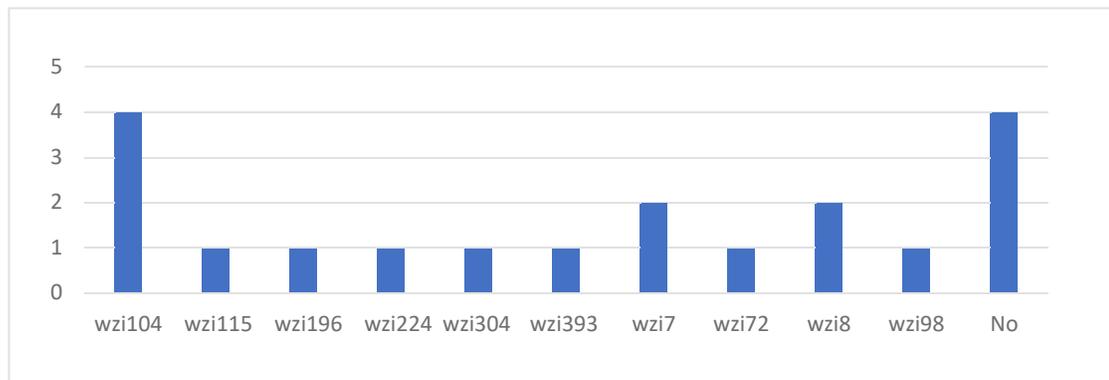
Autoría propia

9.6.2 Serotipo K

Los resultados obtenidos por medio de kleborate fueron inconclusos, pues solo arrojó 2 serotipos K del total de las muestras, el restante de ellas la fiabilidad del resultado es nula. Para dar un resultado más acertado hizo falta la identificación de genes que no se encontraron en el genoma de las *Klebsiella pneumoniae*.

A pesar de que no se pudo identificar claramente los serotipos K, se puede hacer una predicción gracias al alelo *wzi*, dando un porcentaje del 94% de fiabilidad. No se encontró serotipo K1, el cual se ha relacionado con el fenotipo hipervirulento de *Kp* y hubo 1 cepa que arrojó K2 que en conjunto con el K1 son los más estudiados y los serotipos más virulentos. El *wzi104* se encontró relacionado con el ST231 y ST1082 y *wzi7* se correlacionó con ST6. Otros serotipos encontrados con el alelo *wzi* fueron: K7, K8, K54, K51, ver gráfica 8.

Gráfica 8. Diversidad del gen *wzi* en *Klebsiella pneumoniae*



Autoría propia

Discusión

El estudio de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* por medio de herramientas como la secuenciación del genoma completo ha brindado la caracterización global donde está incluido el resistoma y el viruloma (177). En nuestro estudio se encontró que 36,8% de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* son multidrogosresistentes, cifra con tendencia al alza al compararla con otros estudios que analizan la prevalencia de colonización de *Klebsiella pneumoniae* MDRO en tracto gastrointestinal donde las cifras eran del 23% y del 20% para los años 2018 y 2016 respectivamente (178,179). Estos datos nos muestran que la emergencia de KP-MDRO esta activa y es un gran problema de salud pública por su asociación a tasas de mortalidad mayores al 50% (180–182), y por ser factor de riesgo significativo para desarrollar infección en UCI, ya que más del 50% de las infecciones que desarrollan estos pacientes se originan de su misma microbiota, la cual está determinada por factores como la estancia hospitalaria, el tratamiento antibiótico previo, la alteración de las barreras normales como la microflora gastrointestinal o la acidez gástrica, los cuales facilitan el crecimiento excesivo de patógenos (178,179,183).

Al analizar la presencia de genes de resistencia a carbapenémicos en nuestros aislamientos encontramos que el 15,78% portaban genes de resistencia tipo KPC, de los cuales las variantes identificadas fueron KPC-2 y KPC-3, resultado esperado basado en la epidemiología de estudios anteriores sobre colonización de CRKP en TGI realizados en otros países como Estados Unidos y

China donde el KPC-3 y KPC-2 fueron los más comunes respectivamente (178). Como bien se conoce existe la teoría que postula que KPC-2 es el origen de las demás variantes genéticas de KPC lo cual explica su alta prevalencia en todo el mundo y ya que KPC-3 solo difiere de esta por cambios en 4 posiciones de aminoácidos es de esperarse su alta prevalencia especialmente en Estados Unidos, Israel y América Latina (184). En un estudio reciente global la determinación de la presencia de carbapenemasas en Enterobacterales, se encontró que en Suramérica, portaban *bla_{KPC-2}* en un 39% y *bla_{KPC-3}* en un 30% (27,29). En Colombia la resistencia a carbapenémicos por parte de *Klebsiella pneumoniae* va en aumento, según las cifras para el año 2012 fue del 7% (185), y para el año 2017 fue del 16,5% en pacientes de UCI (8), última cifra bastante cercana a la arrojada en nuestra investigación.

Con respecto a las carbapenemasas es muy importante mencionar que existe una diseminación rápida del gen *bla_{KPC}*, que puede estar favorecida por factores como la transmisión horizontal de genes entre microorganismos Gram negativos (184,186), factores que promueven la adquisición del transposón Tn4401, el cual además de transportar carbapenemasas transporta otros elementos de resistencia como QnrA, QnrB y rmtB (181), lo cual conlleva a generar bacterias más resistentes con opciones terapéuticas limitadas. Todo lo anterior contribuye a los altos niveles de resistencia a carbapenémicos en nuestro país, los cuales resultan endémicos y son un evidente problema de salud pública en la actualidad. Aunque la asociación entre el transposón Tn4401 y el ST-258 es ampliamente conocida (184,187), nuestros aislamientos presentaron tipos de secuencia muy variados y no se encontró ninguno de este tipo, por lo cual no podemos hacer una asociación clara entre estos dos.

Los determinantes de resistencia que tuvieron mayor prevalencia fueron los genes de resistencia a las tetraciclinas *tet(A)* y *tet(D)*, los cuales se encontraron en el 42,10% de los aislamientos, cifra baja

comparada con la presencia de resistencia a otros antibióticos como los betalactámicos. Este grupo de antibiótico al ser el más usado en la práctica clínica, muchas veces de forma indiscriminada, ha generado que la tasa de resistencia sea muy alta. Hecho que explica que uno de los grupos antibióticos a los cuales se presentó mayor variedad y cantidad de genes de resistencia fuera a los betalactámicos. En cuanto a los demás grupos de antibióticos, se encontraron genes de resistencia a rifamicinas (*arr-3*) y macrólidos (*mphA*) que no representaron importancia ya que, no son utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de estos microorganismos pero que les permiten ser multidrogoresistentes y capaces de transferir estos genes de resistencia a otro grupo de microorganismos.

Por otro lado, los factores de virulencia encontrados en las muestras arrojaron que 3 de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* fueron más virulentas con un puntaje de 4 puntos, tomando este análisis de virulencia en cepas de *K. pneumoniae* de 2010 a 2020 muestra que ha habido un aumento significativo, duplicando así la media del puntaje y se ha visto un incremento significativo de los genes *iuc* (aerobactina) *iro* (salmochelina), *rmpADC* y *rmpA* (185). La yersiniobactina en nuestro estudio fue el factor de virulencia más común con un 36,5% en *K. pneumoniae*, este en la literatura también es el determinante de virulencia más común (20-50%) (187). La yersiniobactina en un estudio realizado en 2018 fue un fuerte predictor de infecciones como abscesos hepáticos piógenos adquiridos en la comunidad en adultos previamente sanos con un OR 7,4 y un intervalo de confianza (IC) del 95% (186). Otro estudio realizado en Brasil, donde se tomaron muestras de hisopados rectales y aspirados traqueales se encontró que el 84% de los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* mostraron patrones de MDR y también se hallaron genes como *ent B* (enterobactina) en un 100%, yersiniobactina en un 60% y aerobactina en un 40%. También se encontró que un 28% de los aislamientos carecían del gen que codifica a la porina OmpK 36, que se ha asociado a un aumento de resistencia a carbapenémicos. (roumany) Una de las cepas presentó genes esenciales para la hiper mucosidad

(*rmpADC*) de *Klebsiella pneumoniae*, los cuales se han visto y estudiado con mayor frecuencia en países asiáticos como causantes de infecciones (190–192), con una diseminación rápida a otras partes del mundo, este gen se ha asociado a infecciones más graves e invasivas en comparación con cepas que no presentan (187). En nuestro estudio esta presencia del gen hipermucoide se encontró en una cepa con genes que codifican sideróforos, por lo que la probabilidad de producción de una infección grave adquirida en la comunidad es alta (186,187), esto demuestra que el acceso al hierro por parte de la bacteria puede ser fundamental para causar enfermedades invasivas en pacientes inmunológicamente comprometidos y no comprometidos (186).

El serotipo O1 fue el más frecuente en más del 50% de las cepas, este es el más prevalente y se ha asociado a cepas hipervirulentas (81). La cepa con más genes de virulencia asociados presentó la serotipificación O1: K2, uno de los que se ha visto implicado en el desarrollo de sepsis, pero solo el serotipo K es el encargado de inducir infecciones del sistema respiratorio puesto que este modula y protege a la bacteria de la fagocitosis mediada por macrófagos alveolares (76,189).(189,190). No se encontraron cepas extremadamente hipervirulentas y resistentes (XDR), las cuales son un problema de salud pública que ha comenzado a surgir desde hace aproximadamente una década, (191) Hoy en día hay una discusión para definir una cepa como hipervirulenta (hvKp), normalmente se define por sus características fenotípicas de la prueba de la cuerda y la presencia de genes hipermucoideos (*rmpADC* y *rmpA*) pero se ha encontrado que la capacidad de *K. pneumoniae* de producir infección disminuye sin la presencia de sideróforos, al igual que se debe tener en cuenta la interacción del patógeno con el huésped, como edad, comorbilidades, estado nutricional, entre otras (188).

La caracterización molecular de microorganismos resistentes a carbapenémicos como *Klebsiella pneumoniae*, ayuda a fortalecer los programas de vigilancia en instituciones hospitalarias y en el país, así como también realizar una vigilancia activa para la búsqueda de pacientes colonizantes, los cuales

son un foco de transmisión y unos potenciales generadores de infecciones de difícil manejo (26). Todo esto podría generar que, al momento del manejo empírico, se tuviera con mayor claridad posibles patógenos y su perfil de resistencia, dando un tratamiento farmacológico más adecuado, lo que reduciría la mortalidad, la transmisión de estos genes de resistencia y virulencia entre paciente y paciente, disminuir la estancia hospitalaria y con ello también la disminución de costos con un impacto económico claro (38,192).

Conclusiones

- Se obtuvo el 37% de multidrogorresistencia en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, con la presencia de genes de resistencia a tetraciclinas en 100%.
- Se presentó resistencia a carbapenémicos en el 16% de las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, con presencia de genes *bla_{KPC2}* y *bla_{KPC3}* codificantes de carbapenemasas.
- Se presentó diversidad de tipos de secuencia entre los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*, lo cual no permitió hacer ninguna correlación clonal.
- El ST231 fue encontrado en dos aislamientos que presentaron variedad de genes de resistencia como *strB*, *strA*, *qnrB1*, *mphA*, *sul1*, *sul2*, *tet(A)*, *dfrA12*, *CTX-M-15*, *OXA-1*, *TEM-1D*, el cual es epidémico en otras partes del mundo.
- Se encontraron Beta-Lactamasas como TEM-1D y OXA-1, las cuales representan resistencia a antibióticos como Piperacilina-Tazobactam, importante en el tratamiento de infecciones por este tipo de microorganismos.
- Los factores de virulencia se evidenciaron en un 36,5% de las cepas con presencia de genes que codifican yersiniobactina y aerobactina.

- Dos aislamientos presentaron un score de virulencia de 3 puntos, lo cual representan las características de ser más virulentas que las demás y que representaría infecciones más severas y difíciles en su manejo.
- Una de las cepas presentó el gen *rmpADC*, gen esencial en la hipermucosidad de *Klebsiella pneumoniae* el cual un indicador de severidad.
- Estos hallazgos permitirán tener impacto en la reducción de la mortalidad, evitar o disminuir la transmisión de estos genes de resistencia y virulencia entre paciente y paciente, junto con la disminución de la estancia hospitalaria y con ello también la disminución de costos con un impacto económico más claro.

Glosario

Antibiótico: Sustancia que inhibe el crecimiento o la reproducción de bacterias (197).

Bacterias: Microorganismo unicelular sin núcleo diferenciado, algunas de cuyas especies descomponen la materia orgánica, mientras que otras producen enfermedades. (200)

Bacteriemia: Se define como la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo en pacientes con signos y síntomas de infección (121)

Colonización: Acción por la cual los microorganismos se asientan establemente en un nuevo nicho biológico.

Complejo clonal (CC): Se define como una divergencia de nucleótidos en el núcleo genómico de aproximadamente 0,5% entre los diferentes linajes de especies (84)

Disbiosis: Cambios en la composición cuantitativa y cualitativa de MICROBIOTA. Los cambios pueden conducir a una interacción microbiana del huésped alterada o un desequilibrio homeostático que puede contribuir a un estado de enfermedad a menudo con inflamación (202).

Enterobacteriales: Grupo diverso de bacterias Gramnegativas, anaerobias facultativas, no formadoras de esporas dentro de la clase *Gamma proteobacterias* (199)

Infecciones asociadas a la atención en salud: Infecciones que ocurren después del ingreso del hospital y que no estaba en el momento del ingreso del paciente o las causadas 48 horas después del ingreso y hasta 30 días después de su salida hospitalaria, antes conocida como “infecciones nosocomiales” (28).

Infección: Invasión del organismo huésped por microorganismos o sus toxinas o por parásitos que pueden provocar patologías o enfermedades (201).

Klebsiella pneumoniae: Bacteria Gramnegativa, oportunista que se asocia a infecciones en seres humanos.

Linaje: La historia del desarrollo de tipos celulares diferenciados específicos según se remonta a las células madre originales en el embrión (201).

MDRO: Organismos multidrogresistentes, se define como un organismo que presenta resistencia a tres o más grupos de resistencia. (2)

Microbioma: Comunidad de microorganismos asociados a un hospedador junto con sus elementos genéticos, metabolitos e interacciones que se establecen en el entorno que los rodea. (143)

Microbiota: Conjunto de microorganismos (Bacterias, Archaea, Eukarya, hongos y virus) que habitan en el cuerpo humano. (145)

Patógeno: Que causa o produce enfermedad (203).

Plásmido: Moléculas de ADN extra cromosómicas, generalmente circulares, que son auto replicantes y transferibles de un organismo a otro. Se encuentran en una variedad de especies de bacterias, arqueas, hongos, algas y plantas. Se utilizan en ingeniería genética como vectores de clonación (208).

Resistencia: La capacidad de las bacterias para resistir o volverse tolerantes a agentes quimioterapéuticos, agentes antimicrobianos o antibióticos. Esta resistencia puede adquirirse mediante mutación genética o ADN extraño en plásmidos transmisibles (202).

Resistencia a betalactámicos: No susceptibilidad de las bacterias a la acción de los antibióticos betalactámicos. Los mecanismos responsables de la resistencia a los betalactámicos pueden ser la degradación de los antibióticos por las beta-lactamasas, la falta de penetración de los antibióticos o la unión de los antibióticos a los objetivos de baja afinidad (202)

Resistencia bacteriana: proceso que se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que realizan la acción de inhibir o matar. (1)

Sideróforo: Compuestos de bajo peso molecular producidos por microorganismos que ayudan en el transporte y secuestro de hierro férrico (200).

Unidad de cuidados intensivos (UCI): Son servicios dentro del marco institucional hospitalario que poseen una estructura diseñada para mantener las funciones vitales de pacientes en riesgo de perder la vida, creadas con la finalidad de recuperación (207).

Virulencia: El grado de patogenicidad dentro de un grupo o especie de microorganismos o virus según lo indicado por las tasas de letalidad y / o la capacidad del organismo para invadir los tejidos del huésped (201).

Bibliografía

1. Magira Islam S. & Niederman M. S. EE. Multidrug resistant organism infections in a medical ICU: Association to clinical features and impact upon outcome. *Medicina intensiva*. 2018;42(4):225–234.
2. Gorrie CL, Mirčeta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clinical infectious diseases*. 2017;65(2):208–15.
3. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States [Internet]. 2019. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/Biggest-Threats.html.%0A>
4. World Health Organization. Antimicrobial resistance [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 8]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
5. Sievert DM Edwards JR et al RP, Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, et al. No Title. 2013;34(1):1–14. Available from: <https://www.jstor.org/stable/10.1086/668770>
6. Gould IM, Wang G-Q, Wu J-J, Lim VKE, Hutchinson J, Walsh T, et al. MDRO Beijing Consensus Meeting Report: Global burden of multidrug-resistant organisms' current antimicrobial resistance problems in Asia-Pacific. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [Internet]. 2014;2(1)(1):7–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2013.10.005>
7. Cassini A Plachouras D et al. HLD. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis*. 19(1):56–66.
8. Lucia LCA, Alvarez Carlos A. Resultados de la vigilancia de la resistencia bacteriana Año 2017 . Grupo GREBO [Internet]. 2019;(Boletín No 10). Available from: <https://www.grupogrebo.org/wp-content/uploads/2019/08/Boletin-10.pdf>
9. Salud IN de. Boletín epidemiológico semanal 10 de 2020. Boletín epidemiológico semanal. 2020.
10. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *The Lancet infectious diseases*. 2017;17(2):153–63.
11. Guh AY, Bulens SN, Mu Y, Jacob JT, Reno J, Scott J, et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in 7 US Communities, 2012-2013. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2015;314(14):1479–87.
12. Qin X, Wu S, Hao M, Zhu J, Ding B, Yang Y, et al. The Colonization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Resistance Mechanisms, and Risk Factors in Patients Admitted to Intensive Care Units in China. *The Journal of infectious diseases*. 2020;221(Supplement_2):S206–14.
13. Lucia LCA, Alvarez Carlos A. Resultados de la vigilancia de la resistencia bacteriana Año 2017 . Grupo GREBO. 2019;(Boletín No 10).

14. Silva JB da, Jr., Espinal M, Ramón-Pardo P. Antimicrobial resistance: time for action. *Revista Panamericana de Salud Pública* [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 13];44. Available from: [/pmc/articles/PMC7521182/](#)
15. Pormohammad A, Nasiri MJ, Azimi T. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance* [Internet]. 2019 [cited 2021 Sep 13];12:1181. Available from: [/pmc/articles/PMC6512575/](#)
16. Pettigrew PhD MM, Johnson PhD D(ABMM) JK, Harris MD MPH AD. The human microbiota: novel targets for hospital-acquired infections and antibiotic resistance. *Annals of Epidemiology*. 2016;26(5):342–7.
17. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the Human Infant Intestinal Microbiota. *PLOS Biology* [Internet]. 2007 Jul [cited 2021 Sep 13];5(7):e177. Available from: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0050177>
18. Cresci GA, Bawden E. Gut Microbiome. *Nutrition in Clinical Practice* [Internet]. 2015 Dec 8;30(6):734–46. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1177/0884533615609899>
19. Becattini Taur Y. & Pamer E. G. S. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2016;22(6):458–478.
20. Thatrimontrichai & Apisarnthanarak A. A. Active surveillance culture program in asymptomatic patients as a strategy to control multidrug-resistant gram-negative organisms: What should be considered? *Journal of the Formosan Medical Association*. 2019;
21. Podschun R UU. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;(11(4)):589–603.
22. Effah Sun T. Liu S. et al. CY. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2020;19(1).
23. Colombia. M de S de. Plan Nacional De Respuesta a la Resistencia a los antimicrobianos. 2018;
24. López J A Navon-Venezia S Correa A L Torres J A Briceño D F et al CA. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3 producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:52–6.
25. Alós J-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. 2014;33(10)(10):692–9. Available from: <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0213005X14003413>
26. Bottiglieri M. Colonización por bacterias multirresistentes en unidades de alto riesgo de una institución polivalente. *Clínica Universitaria Reina Fabiola*. 2016;
27. de La Cadena E, Correa A, Muñoz JS, Rojas LJ, Hernández-Gómez C, Pallares C, et al. Molecular characterisation of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex in Colombia: bla_{sub}.KPC and the “changing landscape.” *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2018;13:184–9.
28. Mielke M. Prevention and Control of Health Care–Associated Infections. *Goldman’s Cecil Medicine*. 2010;300(6):1780–1787.
29. Huerta-Gutiérrez R et al. “One-day point prevalence of healthcare-associated infections and antimicrobial use in four countries in Latin America.” .

- International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2019;86:157–66.
30. Goldman L, Schafer AI. Prevention and Control of Health Care–Associated Infections. In: Goldman-Cecil Medicine. 26th edition. Philadelphia, PA: Elsevier; 2020. p. 1825–32.
 31. Yokoe DS, Anderson DJ, Berenholtz SM, Calfee DP, Dubberke ER, Eilingson KD, et al. A Compendium of Strategies to Prevent Healthcare-Associated Infections in Acute Care Hospitals: 2014 Updates. *Infection Control & Hospital Epidemiology* [Internet]. 2014 Sep [cited 2021 Sep 13];35(S2):S21–31. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/infection-control-and-hospital-epidemiology/article/compendium-of-strategies-to-prevent-healthcare-associated-infections-in-acute-care-hospitals-2014-updates/75D6F30B783B52FABAAA29C136E8FA03>
 32. Magill SS, Dumyati G, Ray SM, Fridkin SK. Evaluating Epidemiology and Improving Surveillance of Infections Associated with Health Care, United States. *Emerging infectious diseases*. 2015 Sep;21(9):1537–42.
 33. Magill SS, Janelle SJ, et al. Changes in prevalence of health care-associated infections in U.S. hospitals. *N Engl J Med*. 2018;379:1732–44.
 34. Control EC for DP and. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units . ECDC. Stockholm: ECDC; 2019.
 35. Velázquez-Acosta C, Cornejo-Juárez P, Volkow-Fernández P. Multidrug resistance E-ESKAPE strains isolated from blood cultures in patients with cancer. *Salud pública de México*. 2018 Mar;60(2):151–7.
 36. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*. 2009;48(1):1–12.
 37. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA, et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *The New England journal of medicine*. 2014;370(13):1198–208.
 38. Umscheid CA, Doshi JA, et al. Estimating the proportion of healthcare-associated infections that are reasonably preventable and the related mortality and costs. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011;32:101–14.
 39. Acosta-Gnass SI. Manual de control de infecciones y epidemiología hospitalaria. Organización Panamericana de la Salud. 2011;
 40. Tacconelli E, Magrini N, Kahlmeter G, Singh N. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. World Health Organization. 2017;27:318–27.
 41. Ellingson K, Haas J, Aiello A. Strategies to prevent healthcare-associated infections through hand hygiene. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014 Aug;35(08):937–60.
 42. Cobrado L, Azevedo MM, et al. High-touch surfaces: microbial neighbours at hand. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(1):2053–62.
 43. Hartley S, Valley S, Kuhn L, Washer LL, Gandhi T, Meddings J, et al. Overtreatment of Asymptomatic Bacteriuria: Identifying Targets for Improvement. *Infection control and hospital epidemiology*. 2015 Apr;36(4):470–3.
 44. Akhloufi H, Streefkerk R, Melles D, Steenwinkel J, Schurink C, Verkooijen R, et al. Point prevalence of appropriate antimicrobial therapy in a Dutch university

- hospital. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* [Internet]. 2015;34(8):1631–7. Available from: <https://www.narcis.nl/publication/RecordID/oai:repub.eur.nl:82748>
45. Rice LB. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*. 2008;197(8):1079–81.
 46. De Waele Boelens J. & Leroux-Roels I. JJ. Multidrug-resistant bacteria in ICU: fact or myth. *Current opinion in anaesthesiology*. 2020;33(2):156–161.
 47. Anaya-Baz B, Maldonado N, Palacios-Baena ZR, Palomo V, Pezzani MD, Chiesi S, et al. Systematic literature review of the burden and outcomes of infections due to multidrug-resistant organisms in Europe: the ABOUT-MDRO project protocol. *BMJ open*. 2020;10(5):e030608.
 48. Barrasa-Villar JI, Aibar-Remón C, Prieto-Andrés P, Mareca-Doñate R, Moliner-Lahoz J. Impact on Morbidity, Mortality, and Length of Stay of Hospital-Acquired Infections by Resistant Microorganisms. *Clinical infectious diseases*. 2017;65(4):644–52.
 49. Prevention C for DC and. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019 [Internet]. 2019. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/Biggest-Threats.html>
 50. Cohen Mitchell L. *Changing patterns of infectious diseases*. Macmillan Magazines Ltd. 2000;406.
 51. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infection control and hospital epidemiology* [Internet]. 2016;37(11):1288–301. Available from: <https://search.datacite.org/works/10.1017/ice.2016.174>
 52. Maechler F, Peña Diaz LA, Schröder C, Geffers C, Behnke M, Gastmeier P. Prevalence of carbapenem-resistant organisms and other Gram-negative MDRO in German ICUs: first results from the national nosocomial infection surveillance system (KISS). *Infection* [Internet]. 2015 Apr;43(2):163–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25395161>
 53. Suwantararat N, Carroll KC. Epidemiology and molecular characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in Southeast Asia. *Antimicrobial resistance & infection control* [Internet]. 2016;5(1):15. Available from: <https://search.datacite.org/works/10.1186/s13756-016-0115-6>
 54. Uribe AG, Serna LFC, Guerrero CED, Bernal GB, Saldarriaga EDJO, Vergara JFV. Programa de prevención, vigilancia y control de infecciones asociadas a la atención en salud-iaas y la resistencia antimicrobiana. *Vitae*. 2020;27(3):2–64.
 55. Salud S distrital de. Resolución Número 073 [Internet]. 2008. Available from: <http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Todo%20IIH/Resoluci%C3%B3n%20073.pdf>
 56. ÁLVAREZ MEH. Resolución 0234 [Internet]. 2005. Available from: <https://asocoldro.com/system/files/WAResoluciones/Resoluci%C3%B2n%200234%20de%202005.pdf>
 57. Instituto Nacional de Salud (INS). Resultados del Programa de Vigilancia por Laboratorio de Resistencia antimicrobiana en Infecciones Asociadas a la

- Atención en Salud (IAAS) 2016 [Internet]. 2016. Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador- eventos/Informacin%20de%20laboratorio/Informe%20Vigilancia%20por%20Laboratorio%20Resistencia%20Antimicrobiana%20y%20Whonet%20IAAS%202016.pdf>
58. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2020;
 59. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Enterobacteriaceae. In: Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases. Ninth edition. New York [u.a.]: Churchill Livingstone Elsevier; 2020. p. 2669–84.
 60. Doi Y, Bonomo RA, Hooper DC, Kaye KS, Johnson JR, Clancy CJ, et al. Gram-Negative Bacterial Infections: Research Priorities, Accomplishments, and Future Directions of the Antibacterial Resistance Leadership Group. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;64(suppl_1):S30–5.
 61. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, S Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the “Enterobacteriales”: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016 Dec;66(12):5575–99.
 62. Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular microbiology*. 2002;37(2):239–53.
 63. Highsmith AK, Jarvis WR. *Klebsiella pneumoniae*: Selected virulence factors that contribute to pathogenicity. *Infection Control*. 1985;6(2):75–7.
 64. Ottow JCG. Ecology, Physiology, And Genetics Of Fimbriae And Pili. *Annual Review of Microbiology*. 1975;29(1):79–108.
 65. Thanassi DG, Saulino ET, Lombardo M-J, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. The PapC usher forms an oligomeric channel: Implications for pilus biogenesis across the outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(6):3146–51.
 66. Dodson KW, Jacob-Dubuisson F, Striker RT, Hultgren SJ. Outer-membrane PapC molecular usher discriminately recognizes periplasmic chaperone-pilus subunit complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(8):3670–4.
 67. Merz AJ, So M, Sheetz MP. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature (London)*. 2000;407(6800):98–102.
 68. Dutta PR, Cappello R, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae. *Infection and immunity*. 2002;70(12):7105–13.
 69. Sandkvist M. Biology of type II secretion. *Molecular Microbiology*. 2001 Apr;40(2):271–83.
 70. Galán JE. Type III Secretion Machines: Bacterial Devices for Protein Delivery into Host Cells. *Science (American Association for the Advancement of Science)*. 1999;284(5418):1322–8.

71. Escolar L, Pérez-Martín J, de Lorenzo V. Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *Journal of bacteriology*. 1999;181(20):6223–9.
72. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2016;80(3):629–61.
73. Shi Y, Yang H, Chu M. *Klebsiella*. In: *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Academic Press; 2020. p. 233–57.
74. Conlan S, Kong HH, Segre JA. Species-Level Analysis of DNA Sequence Data from the NIH Human Microbiome Project. *PloS one*. 2012;7(10):e47075.
75. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future microbiology*. 2014;9(9):1071–81.
76. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence* [Internet]. 2013;4(2):107–18. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.22718>
77. Pan Y-J, Lin T-L, Chen Y-H, Hsu C-R, Hsieh P-F, Wu M-C, et al. Capsular Types of *Klebsiella pneumoniae* Revisited by *wzc* Sequencing. *PloS one*. 2013;8(12):e80670.
78. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence*. 2013;4(2):107–18.
79. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, et al. *wzi* Gene Sequencing, a Rapid Method for Determination of Capsular Type for *Klebsiella* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013 Dec 1;51(12).
80. Ramos PIP, Picão RC, Vespero EC, Pelisson M, Zuleta LFG, Almeida LGP, et al. Pyrosequencing-based analysis reveals a novel capsular gene cluster in a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate identified in Brazil. *BMC microbiology*. 2012;12(1):173.
81. Hsieh P-F, Lin T-L, Yang F-L, Wu M-C, Pan Y-J, Wu S-H, et al. Lipopolysaccharide O1 Antigen Contributes to the Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Pyogenic Liver Abscess. *PloS one* [Internet]. 2012;7(3):e33155. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427976>
82. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. In: *Urinary Tract Infections*. Washington, DC, USA: ASM Press; 2017. p. 435–57.
83. March C, Cano V, Moranta D, Llobet E, Pérez-Gutiérrez C, Tomás JM, et al. Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. *PloS one*. 2013;8(2):e56847.
84. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature reviews Microbiology*. 2020 Jun;18(6):344–59.
85. Gomez-Simmonds A, Uhlemann A-C. Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of infectious diseases*. 2017;215(suppl_1):S18–27.
86. Angelis G de, Giacomo P del, Posteraro B, Sanguinetti M, Tumbarello M. Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol 21, Page 5090 [Internet]. 2020 Jul 18 [cited 2021 Sep

- 11];21(14):5090. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/14/5090/htm>
87. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Sep 12];33(2). Available from: <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>.
 88. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, et al. First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. 2006;50(8):2880–2. Available from: <http://aac.asm.org/content/50/8/2880.abstract>
 89. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends in microbiology (Regular ed)* [Internet]. 2014 Dec;22(12):686–96. Available from: <https://search.datacite.org/works/10.1016/j.tim.2014.09.003>
 90. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* [Internet]. 2015;59(10):5873–84. Available from: <https://search.datacite.org/works/10.1128/aac.01019-15>
 91. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: The quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews* [Internet]. 2005 [cited 2021 Sep 13];18(2):306–25. Available from: <https://journals.asm.org/journal/cmvr>
 92. Mack AR, Barnes MD, Taracila MA, Hujer AM, Hujer KM, Cabot G, et al. A Standard Numbering Scheme for Class C β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 11];64(3). Available from: </pmc/articles/PMC7038296/>
 93. Lee C-R, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Frontiers in microbiology* [Internet]. 2016;7:895. Available from: <https://search.datacite.org/works/10.3389/fmicb.2016.00895>
 94. Jacoby G. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis*. 2005 Jul 15;41(Suppl 2):S120–6.
 95. J Strahilevitz GJDHAR. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Oct;22(4):664–89.
 96. Salah FD, Soubeiga ST, Ouattara AK, Sadji AY, Metuor-Dabire A, Obiri-Yeboah D, et al. Distribution of quinolone resistance gene (qnr) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2019 8:1 [Internet]. 2019 Jun 18 [cited 2021 Sep 13];8(1):1–8. Available from: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-019-0552-0>
 97. Liang C, Xing B, Yang X, Fu Y, Feng Y, Zhang Y. Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance on *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in China. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* [Internet]. 2015 [cited 2021 Sep 13];8(1):1381. Available from: </pmc/articles/PMC4358596/>

98. YM A, AJ K, JY L. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents* [Internet]. 2014 [cited 2021 Sep 13];44(1):8–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24794735/>
99. Maraki S, Papadakis IS. Evaluation of antimicrobial combinations against colistin-resistant carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Chemotherapy*. 2015 Dec 1;27(6):348–52.
100. Boumghar-Bourtchai L, Mariani-Kurkdjian P, Bingen E, Filliol I, Dhalluin A, Ifrane SA, et al. Macrolide-resistant *Shigella sonnei*. *Emerging Infectious Diseases*. 2008 Aug;14(8):1297–9.
101. Leclercq R. Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2002 Feb 15 [cited 2021 Sep 13];34(4):482–92. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/34/4/482/412492>
102. Nguyen MCP, Woerther P-L, Bouvet M, Andremont A, Leclercq R, Canu A. *Escherichia coli* as Reservoir for Macrolide Resistance Genes. *Emerging Infectious Diseases* [Internet]. 2009 Oct [cited 2021 Sep 13];15(10):1648. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19428664/>
103. KK O, C U, N VK, H L, M B, J L, et al. The *mef(A)* gene predominates among seven macrolide resistance genes identified in gram-negative strains representing 13 genera, isolated from healthy Portuguese children. *Antimicrobial agents and chemotherapy* [Internet]. 2004 Sep [cited 2021 Sep 13];48(9):3451–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15328110/>
104. Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD. The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2010 Feb 28;67(3).
105. Grossman TH. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2016 Apr;6(4).
106. O S. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary research* [Internet]. 2001 [cited 2021 Sep 14];32(3–4):261–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11432417/>
107. Eliopoulos GM, Huovinen P. Resistance to Trimethoprim-Sulfamethoxazole. *Clinical Infectious Diseases* [Internet]. 2001 Jun 1 [cited 2021 Sep 14];32(11):1608–14. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/32/11/1608/464214>
108. Floss HG, Yu TW. Rifamycin - Mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chemical Reviews*. 2005 Feb;105(2):621–32.
109. Tupin A, Gualtieri M, Roquet-Banères F, Morichaud Z, Brodolin K, Leonetti JP. Resistance to rifampicin: at the crossroads between ecological, genomic and medical concerns. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010 Jun 1;35(6):519–23.
110. da Fonseca ÉL, Freitas FDS, de Amorim JC, Vicente ACP. Detection of new *arr-4* and *arr-5* gene cassettes in clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* strains from Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. 2008 May [cited 2021 Sep 14];52(5):1865–7. Available from: <https://journals.asm.org/journal/aac>
111. Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends in microbiology (Regular ed)*. 2014 Dec;22(12):686–96.

112. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends in microbiology (Regular ed)*. 2016 Dec;24(12):944–56.
113. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature reviews Microbiology* [Internet]. 2020 Jun;18(6):344–59. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32055025>
114. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(10):5873–84.
115. Adler A, Khabra E, Chmelnitsky I, Giakkoupi P, Vatopoulos A, Mathers AJ, et al. Development and validation of a multiplex PCR assay for identification of the epidemic ST-258/512 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease*. 2014;78(1):12–5.
116. Li W, Sun G, Yu Y, Li N, Chen M, Jin R, et al. Increasing Occurrence of Antimicrobial-Resistant Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* Isolates in China. *Clinical infectious diseases*. 2014;58(2):225–32.
117. Lin WH, Wang MC, Tseng CC, Ko WC, Wu AB, Zheng PX, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing community-acquired urinary tract infections. *Infection*. 2010 Dec;38(6):459–64.
118. Gould IM, Wang G-Q, Wu J-J, Lim VKE, Hutchinson J, Walsh T, et al. MDRO Beijing Consensus Meeting Report: Global burden of multidrug-resistant organisms' current antimicrobial resistance problems in Asia-Pacific. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2014;2(1)(1):7–9.
119. Jiun-Ling Wang, Kuan-Yu Chen, Chi-Tai Fang, Po-Ren Hsueh, Pan-Chyr Yang S-CC. Changing Bacteriology of Adult Community-Acquired Lung Abscess in Taiwan: *Klebsiella pneumoniae* versus Anaerobes. *Clinical Infectious Diseases*. 40(7):915–22.
120. Luyt C, Hékimian G, Koulenti D CJ. Microbial cause of ICU-acquired pneumonia: hospital-acquired pneumonia versus ventilator-associated pneumonia. *Current opinion in critical care*. 2018;5(24):332–8.
121. Namikawa H, Niki M, Niki M, Yamada K, Nakaie K, Sakiyama A et al. Clinical and virulence factors related to the 30-day mortality of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia at a tertiary hospital: a case–control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 12(38):2291–7.
122. Chetcuti Zammit S, Azzopardi N SJ. Mortality risk score for *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *European Journal of Internal Medicine*. 2014;25(6):571–6.
123. Li F, Song M, Xu L, Deng B, Zhu S LX. Risk factors for catheter-associated urinary tract infection among hospitalized patients: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Journal of advanced nursing*. 75(3):517–27.
124. Baenas DF, Saad EJ, Diehl FA, Musso D, González JG, Russo V et al. Epidemiología de las infecciones urinarias asociadas a catéter y no asociadas a catéter en un hospital universitario de tercer nivel. *Revista chilena de infectología*. 2018;35(3):246–52.
125. Rahimian J, Wilson T, Oram V, Holzman RS. Pyogenic Liver Abscess: Recent Trends in Etiology and Mortality. *Clinical Infectious Diseases*. 2004 Dec;39(11):1654–9.

126. Serraino C, Elia C, Bracco C, Rinaldi G, Pomero F, Silvestri A, et al. Characteristics and management of pyogenic liver abscess. *Medicine*. 2018 May;97(19):e0628.
127. Yang C-C, Yen C-H, Ho M-W, Wang J-H. Comparison of pyogenic liver abscess caused by non-Klebsiella pneumoniae and Klebsiella pneumoniae. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2004 Jun;37(3):176–84.
128. Dever JB, Sheikh MY. Review article: spontaneous bacterial peritonitis - bacteriology, diagnosis, treatment, risk factors and prevention. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2015 Jun;41(11):1116–31.
129. Tang L-M, Chen S-T. Klebsiella pneumoniae Meningitis: Prognostic Factors. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 1994 Jan 8;26(1):95–102.
130. Wen-Liang Y, Yin-Ching C. Clinical features, diagnosis, and treatment of klebsiella pneumoniae infection. *UpToDate*. 2019 Apr 18;
131. Cruz-López F, Villarreal-Treviño L, Camacho-Ortiz A, Morfín-Otero R, Flores-Treviño S, Garza-González E. Acquired Genetic Elements that Contribute to Antimicrobial Resistance in Frequent Gram-Negative Causative Agents of Healthcare-Associated Infections. *The American journal of the medical sciences*. 2020 Jul;
132. Lee C-R, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:895.
133. Saenz Valeri L AL. Resultados de la vigilancia de la resistencia bacteriana Año 2018. Grupo para el control de resistencia bacteriana en Bogotá. 2019;
134. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, et al. First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of Klebsiella pneumoniae from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006;50(8):2880–2.
135. Rojas LJ, Mojica MF, Blanco VM, Correa A, Montealegre MC, De La Cadena E, et al. Emergence of Klebsiella pneumoniae Coharboring KPC and VIM Carbapenemases in Colombia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;57(2):1101–2.
136. Rojas LJ, Weinstock GM, De La Cadena E, Diaz L, Rios R, Hanson BM, et al. An Analysis of the Epidemic of Klebsiella pneumoniae Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: Convergence of Two Evolutionary Mechanisms Creates the “Perfect Storm.” *The Journal of infectious diseases*. 2018;217(1):82–92.
137. Naas T, Bonnin RA, Cuzon G, Villegas M-V, Nordmann P. Complete sequence of two KPC-harboring plasmids from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(8):1757–62.
138. European Centre for Disease Prevention and Control. Rapid Risk Assessment Carbapenem resistant Enterobacteriaceae - second update 26 September 2019. *GIMPIOS*. 2019 Oct;9(4):136–49.
139. Xercavins M, Jiménez E, Padilla E, Riera M, Freixas N, Boix-Palop L, et al. High clonal diversity of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae isolates from clinical samples in a non-outbreak situation. A cohort study. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2020 Dec 3;9(1):5.

140. Parveen RM, Khan MA, Menezes GA, Harish BN, Parija SC, Hays JP. Extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* from blood cultures in Puducherry, India. *The Indian journal of medical research*. 2011 Sep;134:392–5.
141. Fridkin S, McDonald LC, Ricks P, Patel J, Limbago B, Cardo D, et al. Vital Signs. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2013;62(9):165–70.
142. Lob SH, Biedenbach DJ, Badal RE, Kazmierczak KM, Sahm DF. Antimicrobial resistance and resistance mechanisms of Enterobacteriaceae in ICU and non-ICU wards in Europe and North America: SMART 2011–2013. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2015 Sep;3(3).
143. Imbert-Palafox JL, Mata-Olvera A, Becerril-Flores MA, Molina-Trinidad EM, Montejano-Rodríguez JR. El Microbioma Humano: Entre la salud y la enfermedad. *Educación y Salud Boletín Científico Instituto de Ciencias de la Salud Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo*. 2019;8(15):277–88.
144. Pérez PC. El microbioma humano. Su papel en la salud y en algunas enfermedades. *Cirugía y Cirujanos*. 2005;73(5).
145. Gordon JI, Knight R. El microbioma humano. 19th ed. Harrison. *Principios de Medicina Interna*. McGraw-Hill; 2019.
146. Lopez I. microbioma-humano-un-universo-en-nuestro-interior. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular [Internet]*. 2018;197:7. Available from: <https://sebbm.es/revista/articulos/500-microbioma-humano-un-universo-en-nuestro-interior.pdf>
147. Sebastián-Domingo J-J, Sánchez-Sánchez C. De la flora intestinal al microbioma. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 2018;110(1):51–6.
148. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in microbiology*. 2008;159(3):187–93.
149. Uzcátegui U O. Microbioma humano. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*. 2016;76(1):1–3.
150. Cresci GA, Bawden E. Gut Microbiome. *Nutrition in Clinical Practice*. 2015 Dec 8;30(6):734–46.
151. Aceves R de JM, Gutiérrez ACI, Alarcón GT, Izeta ACMM. La microbiota y el microbioma intestinal humano. (Entre las llaves del reino y una nueva caja de Pandora). Vol. 71.
152. Gail A, Emmy B. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know . 2015;30:734–746. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26449893/>
153. Aceves R de JM, Gutiérrez ACI, Alarcón GT, Izeta ACMM. La microbiota y el microbioma intestinal humano. (Entre las llaves del reino y una nueva caja de Pandora). Vol. 71.
154. de R de la SE, Clínica EI y M. *Procedimientos en Microbiología Clínica*.
155. Gómez Duque M, Acero F. Composición y funciones de la flora bacteriana intestinal. *Repertorio de medicina y cirugía*. 2011;20(2):74–82.
156. Guarner F, Malagelada JR. La flora bacteriana del tracto digestivo. *Gastroenterología y hepatología*. 2003 Feb;26(Supl.1):1–5.
157. Meng C, Bai C, Brown TD, Hood LE, Tian Q. Human Gut Microbiota and Gastrointestinal Cancer. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 2018 Feb;16(1).

158. Gagnière J, Raisch J, Veziat J, Barnich N, Bonnet R, Buc E, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* [Internet]. 2016;22(2):501–18. Available from: <http://lib.cqvip.com/qk/84123X/201602/667870118.html>
159. Rambach A. CHROMagar™ Orientation Chromogenic Media Focus on Urinary tract pathogens [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 13]. Available from: <http://www.chromagar.com/clinical-microbiology-chromagar-orientation-focus-on-urinary-tract-pathogens-25.html#.YUEGDo4zblU>
160. Rambach A. CHROMagar™ mSuperCARBA™ Chromogenic Media CRE Epidemiologic Issues [Internet]. 2020 [cited 2021 Sep 13]. Available from: <http://www.chromagar.com/clinical-microbiology-chromagar-msupercarba-cre-epidemiologic-issues-76.html#.YUEG3Y4zblU>
161. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15).
162. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15).
163. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*. 2012 May;19(5).
164. Hasman H, Saputra D, Sicheritz-Ponten T, Lund O, Svendsen CA, Frimodt-Moller N, et al. Rapid Whole-Genome Sequencing for Detection and Characterization of Microorganisms Directly from Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014 Jan 1;52(1).
165. Roosaare M, Vaher M, Kaplinski L, Möls M, Andreson R, Lepamets M, et al. StrainSeeker: fast identification of bacterial strains from raw sequencing reads using user-provided guide trees. *PeerJ*. 2017 May 18;5.
166. Larsen M v., Cosentino S, Lukjancenko O, Saputra D, Rasmussen S, Hasman H, et al. Benchmarking of Methods for Genomic Taxonomy. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014 May 1;52(5).
167. Larsen MV Rasmussen S Friis C Hasman H Marvig RL Jelsbak L Sicheritz-Pontén T Ussery DW Aarestrup FM and Lund O. CS. Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012;(1355-1361.).
168. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020 Dec 1;75(12).
169. Becton Dickinson GmbH. Instrucciones de uso - Medios en placa listos para usar. 2019 [cited 2021 Aug 19];1–7. Available from: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8811>
170. Calderón R, Sacsquispe R, Pasterán F, Galas marcelo, Soto J, Riveros J, et al. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Klebsiella pneumoniae* Y *Enterobacter cloacae* PRODUCTORAS DE β -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO TIPO SHV-5 EN UNA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATAL DE LIMA. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* [Internet]. 2003 Jul;1–7. Available from: 03/06/2021 http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342003000300002

171. NCBI. *Klebsiella pneumoniae* (ID 815) [Internet]. [cited 2021 Aug 18]. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Klebsiella%20pneumoniae%5BOrganism%5D&cmd=DetailsSearch>
172. Babini GS, Livermore DM. Are SHV β -Lactamases Universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000 Aug;44(8).
173. Galas M, Red WHONET-Argentina. Grupo KES. Servicio ANTIMICROBIANOS Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. 2000;1–52.
174. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. OXA beta-lactamase [Internet]. [cited 2021 Sep 14]. Available from:
<https://card.mcmaster.ca/ontology/36026>
175. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. TEM beta-lactamase [Internet]. [cited 2021 Sep 14]. Available from:
<https://card.mcmaster.ca/ontology/36023>
176. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. ACT beta-lactamase [Internet]. [cited 2021 Sep 14]. Available from:
<https://card.mcmaster.ca/ontology/36211>
177. Uelze L, Grütze J, Borowiak M, Hammerl JA, Juraschek K, Deneke C, et al. Typing methods based on whole genome sequencing data. *One Health Outlook* 2020 2:1 [Internet]. 2020 Feb 18 [cited 2021 Sep 15];2(1):1–19. Available from:
<https://onehealthoutlook.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42522-020-0010-1>
178. Qin X, Wu S, Hao M, Zhu J, Ding B, Yang Y, et al. The Colonization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Resistance Mechanisms, and Risk Factors in Patients Admitted to Intensive Care Units in China. *The Journal of Infectious Diseases*. 2020 Mar 16;221(Supplement_2).
179. Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L, et al. Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere*. 2016 Oct 26;1(5).
180. Bassetti M, Righi E, Carnelutti A, Graziano E, Russo A. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2018 Oct 3;16(10).
181. Peres D, Pereira-Rocha N, Alves C, Correia S. Epidemiology of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Portuguese Tertiary Hospital. *European Journal of Public Health* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Oct 17];30(Supplement_5). Available from:
https://academic.oup.com/eurpub/article/30/Supplement_5/ckaa166.725/5913665
182. Kernéis S, Lucet JC, Santoro A, Meschiari M. Individual and collective impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in patients admitted to the ICU. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [Internet]. 2021 Jan 29 [cited 2021 Oct 17];76(Supplement_1):i19–26. Available from:
https://academic.oup.com/jac/article/76/Supplement_1/i19/6127046
183. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018 Jan 22;8.

184. Chen L, Anderson, Paterson. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infection and Drug Resistance*. 2012 Sep;
185. Hernández-Gómez C, Blanco VM, Motoa G, Correa A, Maya JJ, de la Cadena E, et al. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica*. 2013 Nov 5;34(0).
186. Vera-Leiva A, Barría-Loaiza C, Carrasco-Anabalón S, Lima C, Aguayo-Reyes A, Domínguez M, et al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista chilena de infectología*. 2017 Oct;34(5).
187. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular Epidemiology of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United States: Clonal Expansion of Multilocus Sequence Type 258. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009 Aug;53(8).
188. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nature Communications* 2021 12:1 [Internet]. 2021 Jul 7 [cited 2021 Sep 14];12(1):1–16. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-24448-3>
189. KE H, H W, RN Z, S B, CA W, D D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2015 Jul 7 [cited 2021 Sep 14];112(27):E3574–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26100894/>
190. Li W, Sun G, Yu Y, Li N, Chen M, Jin R, et al. Increasing Occurrence of Antimicrobial-Resistant Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* Isolates in China. *Clinical infectious diseases* [Internet]. 2014;58(2):225–32. Available from: <https://search.datacite.org/works/10.1093/cid/cit675>
191. Wyres KL, Nguyen TNT, Lam MMC, Judd LM, van Vinh Chau N, Dance DAB, et al. Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from South and Southeast Asia. *Genome Medicine* 2020 12:1 [Internet]. 2020 Jan 16 [cited 2021 Sep 14];12(1):1–16. Available from: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-019-0706-y>
192. D G, N D, Z Z, D L, M H, L W, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *The Lancet Infectious diseases* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2021 Sep 14];18(1):37–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28864030/>
193. Chen L, Kreiswirth BN. Convergence of carbapenem-resistance and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018 Jan 1;18(1):2–3.
194. NA K, WN E-T, MR E-A, MT M, KM A. XDR- *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring bla OXA-48: In vitro and in vivo evaluation using a murine thigh-infection model. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ) [Internet].

- 2019 Dec 1 [cited 2021 Sep 15];244(18):1658–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31665915/>
195. Liu C, Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2019 18:1 [Internet]. 2019 Jan 21 [cited 2021 Sep 14];18(1):1–11. Available from: <https://ann-clinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-018-0302-9>
196. Jia H, Li W, Hou T, Ma H, Yang Y, Wu A, et al. The Attributable Direct Medical Cost of Healthcare Associated Infection Caused by Multidrug Resistance Organisms in 68 Hospitals of China. *BioMed Research International* [Internet]. 2019 [cited 2021 Sep 8];2019. Available from: [/pmc/articles/PMC6425381/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6425381/)
197. NCBI. Anti-Bacterial Agents - MeSH - NCBI [Internet]. [cited 2021 Oct 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000900>
198. NCBI. bacteria | Definición | Diccionario de la lengua española | RAE - ASALE [Internet]. [cited 2021 Oct 20]. Available from: <https://dle.rae.es/bacteria>
199. NCBI. Dysbiosis - MeSH - NCBI [Internet]. [cited 2021 Oct 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=dysbiosis>
200. Parte AC, Sardà Carbasse J, Meier-Kolthoff JP, Reimer LC, Göker M. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* [Internet]. 2020; Available from: <https://search.proquest.com/docview/2427309226>
201. NCBI. Infections - MeSH - NCBI [Internet]. [cited 2021 Oct 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68007239>
202. NCBI. Cell Lineage - MeSH - NCBI [Internet]. [cited 2021 Oct 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68019070>
203. RAE. patógeno, patógena | Definición | Diccionario de la lengua española | RAE - ASALE [Internet]. [cited 2021 Oct 20]. Available from: <https://dle.rae.es/pat%C3%B3geno>
204. NCBI. Plasmids - MeSH - NCBI [Internet]. [cited 2021 Oct 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68010957>
205. NCBI. Drug Resistance, Bacterial - MeSH - NCBI [Internet]. [cited 2021 Oct 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68024881>
206. NCBI. Siderophores - MeSH - NCBI [Internet]. [cited 2021 Oct 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68017262>
207. Hondur RC-RM, 1992 undefined. *Medicina intensiva y las unidades de cuidados intensivos*. 651822242 [Internet]. [cited 2021 Oct 20]; Available from: <http://65.182.2.242/RMH/pdf/1992/pdf/Vol60-1-1992.pdf#page=48>
208. NCBI. Virulencia - DeCS - NCBI [Internet]. [cited 2021 Oct 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68014774>