

CAPÍTULO 4

DISEMINACIÓN DE CLONES DE ALTO RIESGO EN *K. pneumoniae* PORTADORA DE CARBAPENEMASA TIPO KPC EN COLOMBIA

Adriana María Correa Bermúdez*

<https://orcid.org/0000-0003-2024-6975>

Marcela Perenguez**

<https://orcid.org/0000-0002-5751-5211>

Resumen. *Klebsiella pneumoniae* ha sido identificada como uno de los principales microorganismos en infecciones asociadas en la atención en salud en Colombia; sin embargo, el aumento de la resistencia en este microorganismo ha venido en aumento en los últimos 10 años. Esta resistencia ha sido asociada a la presencia de enzimas tipo beta-lactamasas, especialmente, las de tipo carbapenemasas. La carbapenemasa más prevalente en este microorganismo es sin duda alguna la carbapenemasa tipo KPC por sus siglas en inglés, *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*.

* Universidad Santiago de Cali. Cali, Colombia
✉ adriana.corea@usc.edu.co

** Universidad Santiago de Cali. Cali, Colombia
✉ marcela025@gmail.com

Para citar este capítulo:

Correa Bermúdez A. y Perenguez, M. Diseminación de clones de alto riesgo en *K. pneumoniae* portadora de carbapenemasa tipo KPC en Colombia. En: Correa Bermúdez, A.; De La Cadena Vivas, E.; Rojas, R.; Falco, A.; Aranaga, C.; Alonso, G. et al. (2020). *Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas*. (pp. 87- 121). Cali, Colombia: Editorial Santiago de Cali.

El éxito de su diseminación ha sido asociado a la presencia de clones denominados de alto riesgo y durante el 2009 se observó en Colombia la presencia varios clones entre ellos los ST258 y ST512; razón por la cual el objetivo de este estudio fue identificar la presencia de clones de alto riesgo, sus características genéticas asociadas a la presencia de genes *bla* y su diseminación en cepas de *K. pneumoniae* portadoras de KPC en hospitales de Colombia. Para ello, se realizó un estudio observacional, utilizando 124 aislados MDR (uno por paciente) del banco de cepas del Grupo de Estudio de la Resistencia Nosocomial en Colombia de CIDEIM. Se realizó el diagnóstico de los genes *bla* utilizando el protocolo de qPCR (*bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTXM}) previamente estandarizado en CIDEIM y secuenciación Sanger para la identificación de las variantes de estos genes. Para la tipificación molecular se utilizó electrophoresis de campos pulsados (PFGE por sus siglas en ingles de *pulsed field gel electrophoresis*) y *Multilocus Sequence Typing* - MLST y finalmente para la caracterización de plásmidos se utilizó PFGE-S1 y PCR-replicon typing - PRT. Los resultados mostraron que los 124 aislados eran portadores del gen *bla*_{KPC} y no se presentó co-expresion con otras carbapenemasas analizadas. Las variantes identificadas fueron KPC-2 y KPC-3. Los resultados de PFGE mostraron siete diferentes grupos de pulsotipos (PTG) dentro de los cuales el PTG5 contiene 85 de los aislados analizados y los resultados de MLST identificaron los ST258 y ST512 asociados a la diseminación de KPC-3; mientras que se observó una gran variabilidad asociada a la diseminación de KPC-2. Adicionalmente, se encontró una gran variabilidad de plásmidos en los aislados analizados. Los resultados obtenidos en esta investigación permiten concluir que la introducción del ST258 generó una expansión clonal para el gen *bla*_{KPC-3} que comenzó a desplazar el gen *bla*_{KPC-2}, el cual se asocia más a una alta diseminación plasmídica.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, *Multilocus Sequence Typing*, clones de alto riesgo.

Abstract. The knowledge of multidrug-resistant microorganisms (MDR) that cause infectious diseases is one of the main pillars of infection control. The main strategies used to achieve this purpose are active surveillance, and the detection of resistance mechanisms and virulence factors. Within all microorganisms, bacteria are recognized as the main causal infectious agents, not only at hospital level, but also in the community. Gram-negative bacteria are the most prevalent bacteria in Latin America, and particularly multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* cause the greatest impact in public health. This is due to the fact that these organisms have been associated with high rates of morbidity and mortality, increase in hospital stay and higher healthcare costs. β -lactamases have been considered the central mechanisms of resistance of the aforementioned bacteria. Even though a wide variety of β -lactamase classes have been identified, the most important, due to significant clinical impact, are the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). According to this information, an observational study was performed, using 124 MDR isolates (one per patient) from the strain bank of the CIDEIM nosocomial resistance in Colombia study group. The *bla* genes were diagnosed using the qPCR protocol (*bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTXM}) previously standardized at CIDEIM and sequencing to identify the variants of these genes. For molecular typing, pulsed field electrophoresis (PFGE) and Multilocus Sequence Typing - MLST were used, and finally, for the characterization of plasmids, PFGE-S1 and PCR-replicon typing - PRT were used. The results showed that of the 124 isolates as carriers of the *bla*_{KPC} enzyme, there was no co-expression with other carbapenemases analyzed. The variants identified were KPC-2 and KPC-3. The PFGE results showed 7 different groups of pulsotypes (PTG) within which the PTG5 contains 85 of the analyzed isolates and the

MLST results identified the ST258 and ST512 associated with the KPC-3 spread; while a great variability associated with the spread of KPC-2 was observed. Additionally, a great variability of plasmids was found in the isolates analyzed. The results obtained in this investigation allow us to conclude that the introduction of ST258 generated a clonal expansion for the bla_{KPC-3} gene that began to displace the bla_{KPC-2} gene, which is more associated with high plasmid dissemination.

1. Introducción

Las infecciones bacterianas causadas por microorganismos multi-resistentes (MDR) y con resistencia extendida (XDR) son uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial (Alós, 2015; Morehead y Scarbrough, 2018). Las infecciones causadas por estos microorganismos han mostrado un gran impacto en la salud pública, asociadas con altas tasas de morbi-mortalidad y altos costos en la atención en salud. La presencia de enzimas beta-lactamasas, como carbapenemasas, se ha descrito como el mecanismo de resistencia más prevalente entre ellas y el de mayor impacto clínico (van Duin y Doi, 2017).

La propagación mundial de estas enzimas se ha atribuido a la presencia de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones e integrones) que generalmente llevan consigo múltiples genes de resistencia o factores de virulencia. Estos elementos han sido diseminados por linajes de bacterias consideradas exitosas por su capacidad de adaptarse y mantenerse por periodos prolongados de tiempo en el medio hospitalario. Estos linajes bacterianos, caracterizados molecularmente por *Multilocus Sequence Typing* (MLST), han sido denominados clones de alto riesgo (*high risk clones*) (Woodford et al., 2011). En Colombia, estudios previos han identificado la presencia de clones de alto riesgo, pero en un período de tiempo corto

durante el 2009, alertando sobre el posible riesgo epidemiológico de su diseminación a nivel nacional (Mojica et al., 2012).

En el 2013 el CDC publicó el estado del arte de los principales microorganismos multirresistentes en Estados Unidos, estima que más de dos millones de personas se infectan cada año por organismos multirresistentes y entre ellos está *K. pneumoniae* resistente a los carbapenémicos (Solomon y Oliver, 2014). *K. pneumoniae* es un patógeno nosocomial responsable de infecciones urinarias, respiratorias, infecciones en piel y tejidos blandos, y bacteriemias (Podschun y Ullmann, 1998), principalmente en las unidades de cuidado intensivo (UCI) y las unidades de neonatos. Posee una gran capacidad de causar brotes hospitalarios posiblemente por poseer múltiples factores de virulencia, entre los que se destaca la cápsula que la protege de la acción bactericida del suero y dificulta la fagocitosis (Brisse et al., 2009). Concomitantemente a estos factores de virulencia, *K. pneumoniae* ha adquirido múltiples mecanismos de resistencia, pero sin duda alguna la presencia de la carbapenemasa KPC (por sus siglas en inglés: *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) representa el problema mas grande en nuestro país.

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)

KPC es una beta-lactamasa tipo carbapenemasa que tiene la capacidad de hidrolizar prácticamente todos los antibióticos beta-lactámicos, incluyendo los carbapenémicos, siendo una de las enzimas más prevalentes y uno de los principales problemas a nivel de resistencia en el mundo. Desde su descubrimiento en Estados Unidos (Yigit et al., 2001), estas carbapenemasas han sido detectadas en muchas especies de *Enterobacterales*, pero *K. pneumoniae* continúa siendo el microorganismo donde más reporta (Cuzon et al., 2010). Se clasifica dentro de la clase

A según la nomenclatura de Ambler. Estas enzimas junto con las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), son las más comunes dentro de los *Enterobacteriales*. Inicialmente fue reportada en Carolina del Norte en Estados Unidos, en un aislamiento de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos dando origen a su nombre (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase- KPC-1). Posteriormente por experimentos de electroporación reveló un plásmido de 50 kb como el portador del gen bla_{KPC} (Yigit et al., 2001).

Su descubrimiento fue seguido por el hallazgo de una variante que fue encontrada en cuatro aislados de *K. pneumoniae* en Maryland, Estados Unidos, con una mutación puntual en la posición 650 (Ser650Gly), denominada como KPC-2. Posteriormente se identificó que las secuencias de KPC-1 y 2 eran iguales <http://www.bldb.eu/>. A partir de ese momento, esta enzima comenzó a reportarse en otras bacterias del orden *Enterobacteriales* en todo el mundo. Estudios realizados en *Salmonella* sp, reportaron que el gen bla_{KPC} estaba flanqueado por 4 ORF (acrónimo en inglés: Open Reading Frames) y los péptidos putativos fueron similares a las proteínas asociadas a elementos genéticos transponibles (transposasas), encontradas en los transposones de la familia *Tn3* (Bratu et al., 2005).

La diseminación inicial estuvo circunscrita a Estados Unidos hasta el 2005 cuando se hizo el primer reporte de esta enzima en Francia en un paciente con historia de viaje reciente a los Estados Unidos. Los estudios moleculares mostraron la presencia de KPC-2 en un plásmido conjugativo de 70 kpb. Los análisis del entorno genético del gen bla_{KPC-2} (2,8 kb aprox.) fueron congruentes con los resultados encontrados anteriormente (Poirel y Nordmann, 2002). El segundo reporte en el mundo de KPC-2 fuera de los Estados Unidos y de pacientes que no presentaron ningún antecedente de viaje a este país, se realizó en Colombia a partir de aislamientos clínicos

de *K. pneumoniae* en dos hospitales de la ciudad de Medellín (Villegas et al., 2006). A partir de ese momento comenzó a reportarse en otros países, existiendo a la fecha más de 46 variantes de esta enzima. (Naas et al., 2017).

En Colombia se reportó la presencia de KPC en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* por primera vez en el mundo (Villegas et al., 2006) y en el 2010 fue reportada en Puerto Rico por primera vez en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* (Robledo et al., 2010).

La relación genética de los patógenos multidrogoresistentes (MDR) y el conocimiento de su distribución en la población, son dos factores esenciales para la comprensión de la epidemiología de las infecciones producidas por estos microorganismos, constituyendo una herramienta básica para el diseño de políticas de control de infecciones (Fey y Rupp, 2003). Para ello, se han desarrollado diferentes metodologías moleculares, entre ellas, la electroforesis de campos pulsados (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*-PFGE), que ha sido considerada como la técnica estándar de tipificación por poseer un alto poder discriminatorio en patógenos que poseen altas tasas de mutación y recombinación, lo cual resulta conveniente en estudios de corto plazo o de brotes a nivel local. Sin embargo, esta herramienta no ha sido utilizada para estudios poblacionales de largo plazo y a nivel global por su baja reproducibilidad y comparabilidad entre laboratorios (Bae et al., 2014). Con estos antecedentes a nivel mundial, se vio la necesidad de implementar una metodología que permitiera el análisis poblacional a un nivel de jerarquía mayor como el MultiLocus Sequencing Typing (MLST), que combinando secuenciación a gran escala, bioinformática y técnicas para el estudio de genética de poblaciones como el eBURST y su versión mejorada el goeBURST, ha demostrado ser una herramienta valiosa para la identificación precisa y seguimiento de linajes MDR considerados como clones de alto riesgo (Mathers et al., 2015; Woodford et al., 2011).

K. pneumoniae portadora de la enzima KPC y su expansión global ha sido evidenciada por numerosos estudios, y la emergencia y rápida diseminación global asociada al clon de alto riesgo ST258 que ha sido reportado en Estados Unidos, Israel (Navon-Venezia et al., 2006), Noruega, Suecia (Samuelsen et al., 2009) Grecia (Karampatakis et al., 2016) y Colombia (Villegas et al., 2006) entre otros. Este ST junto con los ST11 y ST270 conforman el denominado complejo clonal 11 (CC11), que ha sido identificado en Corea como portador de otras beta-lactamasas como SHV-12, SHV-31, CTX-M 14, CTX-M 15 y CTX-M 22 (Ko et al., 2010). No obstante, a diferencia de lo que ocurre con *Escherichia coli* portador de CTX-M 15, múltiples ST diferentes al ST258 de *K. pneumoniae* portan esta enzima entre los cuales están los ST11, ST14, ST15, ST326, ST327 y ST321 (Cuzon et al., 2010).

Por otra parte, otra característica importante a tener en cuenta en la diseminación de esta enzima es la presencia de elementos genéticos relacionados con la movilización y su fácil diseminación. En el año 2008 se confirmó la presencia de un transposón tipo *Tn3*, denominado *Tn4401* asociado al gen bla_{KPC} , el cual presenta una alta variabilidad especialmente en la región intergénica entre el gen bla_{KPC} y la secuencia de inserción denominada *ISKpn7* en la cual se observan deleciones lo que ha permitido identificar más de siete variantes o isoformas, lo cual indica la amplia diversidad del entorno genético que rodea al gen y que puede llevar a diferencias marcadas en su transmisibilidad (Naas et al., 2008; Shen et al., 2009).

En Colombia, *K. pneumoniae* se ubica dentro de las cinco bacterias más aisladas a nivel hospitalario (Hernández-Gómez et al., 2013). La presencia de KPC-2 en *K. pneumoniae* fue reportada por primera vez en el país el año 2006 (Villegas et al., 2006), adicionalmente se reportó la diseminación intercontinental desde Israel a Colombia de una cepa productora de KPC-

3 (Navon-Venezia et al., 2006), así como la caracterización del entorno genético de bla_{KPC} en el transposón *Tn4401* portador de bla_{KPC-2} (Naas et al., 2008). Finalmente, en el año 2009 se encontraron diferentes ST asociados con la diseminación de KPC-2 y KPC-3 en *K. pneumoniae*, en donde los ST258 y ST512 fueron los ST predominantes (Mojica et al., 2012). Sin embargo, el análisis fue realizado solamente con aislados recuperados durante el 2009 con un número limitado de aislamientos, por lo que se vio la necesidad de ampliar el estudio e identificar un panorama más completo.

Después de la diseminación de esta carbapenemasa asociada a determinados linajes a nivel mundial, en Colombia se comenzó a reportar la presencia de estos linajes de manera aislada (Mojica et al., 2012). Sin embargo, el desconocimiento en el tiempo sobre la diseminación de los clones de alto riesgo en el país era evidente. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue identificar la presencia de clones de alto riesgo y su contexto genético en términos de beta-lactamasas en una población de *K. pneumoniae* MDR en Colombia, con el fin de establecer los patrones de diseminación.

2. Metodología

Aislamientos bacterianos

Se realizó un estudio observacional descriptivo. Los aislamientos involucrados en este estudio pertenecen al biobanco del Grupo de Resistencia Bacteriana e Infecciones Asociadas a la Atención en Salud del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) provenientes de pacientes de la Red de hospitales del mismo, recolectados desde el 2008 al 2010 a través de los diferentes proyectos

realizados. El tamaño de la muestra fue seleccionado por conveniencia teniendo en cuenta la disponibilidad de los aislados. Un total de 124 aislados de *K. pneumoniae* previamente caracterizadas como portadoras del gen *bla*_{KPC} fueron seleccionadas. Posteriormente, una vez descongelado el aislamiento se confirmó la presencia del gen *bla*_{KPC} mediante qPCR con sondas *TaqMan* (Tabla 6). A los aislados confirmados se les realizó el proceso de genotipificación.

Tabla 6. Cebadores y sondas diseñadas para la detección de genes *bla* por qPCR

Gen blanco	Cebador / sonda	Secuencia 5' - 3'	Fluoroforo
<i>bla</i> _{KPC}	blaKPC_CONSENSUS_F	GGACACACCCATCCGTTA	FAM
	blaKPC_CONSENSUS_R	GCGGCGTTATCACTGTATTG	
	blaKPC_CONSENSUS_Probe	TCCGCCACCGTCATGCCTGTTG	
<i>bla</i> _{VIM}	VIM CONSENSUS_F	GCTTCGGTCCAGTAGAACTC	CalRed 610
	VIM CONSENSUS_R	AGACGTGCGTGACAACTC	
	VIM CONSENSUS_Probe	AATCGCACAAACCACCATAGAGCA- CACT	
<i>bla</i> _{IMP}	blaIMP_CONSENSUS_F	GCGGCTATAAAATAAAAGGCAGTA	Quasar 705
	blaIMP_CONSENSUS_R	GATGCATACGTGGGGATAGA	
	blaIMP_CONSENSUS_Probe	CACATTTCCATAGCGACAGCAC- GGGC	
<i>bla</i> _{NDM}	qNDM-F	CAACGGTTTGCGATCTG	CalGold 540
	qNDM-R	DGCCATCCCTGACGATCAA	
	NDM_CONCENSUS_Probe	CGCACCGAATGTCTGGCAGCAC	

	qCTX-M F	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKAT- GGC	
bla_{CTX-M}	qCTX-M R	ATCACKCGGRTCGCCXGGRAT	CalRed 610
	CTX-MGrupo1_Probe	CCCGACAGCTGGGAGACGAAA- CGT	
	blaTEM_CONSENSUS_F	TGGCATGACAGTAAGAGAATTATG	
bla_{TEM}	blaTEM_CONSENSUS_R	CAAGGCGAGTTACATGATCC	CalGold 540
	blaTEM_CONSENSUS_Probe	AAGCGGTTAGCTCCTTCG- GTCCTCC	
	blaSHV_CONSENSUS_F	CAGGATCTGGTGGACTACTC	
bla_{SHV}	blaSHV_CONSENSUS_R	CGCTGTTATCGCTCATGG	Quasar 670
	blaSHV_CONSENSUS_Probe	CGCAGAGTTCGCCGACCGTCA	

Fuente: Elaboración propia.

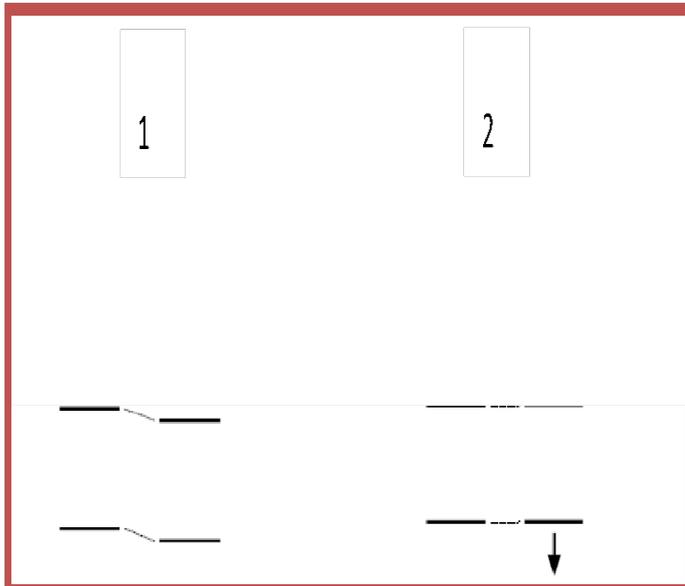
Genotipificación por Electroforesis de Campos Pulsados (*Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE*)

Se realizó la prueba utilizando el protocolo publicado anteriormente (Gautom, 1997) con algunas modificaciones. Brevemente, a partir de cultivo bacteriano puro se preparó una suspensión en buffer CSB (100mM Tris, EDTA 100mM). Aparte se preparó agarosa al 1,6% en buffer TE (10mM Tris, 0,1 mM EDTA) y se conservó a 56°C hasta su utilización. Una mezcla con 200 ul de la suspensión bacteriana y 200 µl de la agarosa Sea Kem Gold (lonza group, U.S.A) al 1,6%, fue utilizada para la preparación de los moldes (Bio-Rad, Laboratories, CA. U.S.A). Para el proceso de lisis bacteriana, los moldes fueron colocados en buffer de lisis (50mM Tris; EDTA 50mM, pH 8.0; 1% N-laurilsarcosina; 1 mg/ml proteinasa K) y lavados con agua destilada estéril y buffer TE a 50°C. Los moldes se almacenaron en buffer TE hasta su utilización. Para la restricción enzimática, se utilizaron 2 mm de cada

molde y se adicionó la enzima de restricción *Xba*I (Promega, Madison, WI) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Finalmente, se preparó un gel de agarosa LE (Lonza Group, U.S.A) al 1%, cada molde se colocó con la ayuda de una laminilla y un asa en los pozos del gel y posteriormente fueron sellados con agarosa al 1%. El gel fue corrido en la cámara de PFGE por 22 horas a 14°C a 6 v/cm con unos tiempos de intercambio inicial de 2.16 s y final de 63.8 s. La visualización del DNA genómico fue realizada mediante tinción del gel utilizando bromuro de etidio (0,3 µg/ml) por 1 hora. El análisis fue realizado utilizando el software Fingerprinting II que permitió: i) Documentar los geles, generando patrones electroforéticos comparables. ii) Normalización de los patrones iii) Generación de una base de datos iv) Comparación e identificación de patrones por similitud. (<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4000076-03A.pdf>). Los criterios de análisis utilizados fueron:

Agrupamiento: El método más común de agrupamiento utilizado en bacterias y deducción de dendograma es UPGMA por sus siglas *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Mean* (Tsakris et al., 2003). Esta herramienta bioinformática permite agrupar de manera jerárquica una población analizada y crear árboles genéticos.

Similitud: Aunque existen varios métodos de comparación para este tipo de análisis (Correlación de Pearson, Coeficiente de Jaccard), el Coeficiente de Dice es el más utilizado en bacterias. El software permite hacer ajustes para la comparación entre diferentes geles, denominado normalización incluye unos porcentajes de tolerancia y optimización; comparando diferentes corridas electroforéticas (Figura 6).



Fuente: Elaboración propia.

Figura 6. Ajustes realizados para la comparación entre geles de PFGE: (1) Tolerancia: cambio mínimo permitido entre dos bandas para considerarlas comparables. (2) Optimización: cambio permitido entre dos patrones para considerarlos comparables. Ambos criterios deben ser tenidos en cuenta para la normalización en el análisis de PFGE usando fingerprinting software (<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4000076-03A.pdf>).

El Coeficiente de Dice define la similitud en términos de porcentaje; se considera entonces qué porcentajes de similitud por encima del 75% sugieren la presencia de un ancestro común, generando grupos clonales.

100%: Idénticos

99 - 85%: Relacionados

86 - 75%. Posiblemente relacionados

Menor del 75%. No relacionados.

Genotipificación por Multilocus Sequence Typing

El esquema para realizar el MLST de *K. pneumoniae* contempla los genes *rpoB* (subunidad B de la ARN polimerasa), *gapA* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), *mdh* (malato deshidrogenasa), *pgi* (fosfoglucoasa isomerasa), *phoE* (fosforina E), *infB* (factor iniciador de la traducción 2), *tonB* (transductor de energía periplasmática) (<http://bigsd.bweb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>): Los cebadores utilizados tanto para la reacción de amplificación, como la reacción de secuenciación se presentan a continuación (Tabla 7).

Tabla 7. Cebadores y condiciones de amplificación para realizar el MLST de *K. pneumoniae*

Locus	Primera amplificación y secuencia	Uso
<i>rpoB</i>	F: Vic3: GGCGAAATGGCWGAGAACCA	amp/seq
	R: Vic2: GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	amp/seq
<i>gapA</i>	F:gapA173: TGAAATATGACTCCACTCACGG	amp/seq
	R:gapA181: CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	amp/seq
<i>mdh</i>	F:mdh130: CCCAACTCGCTTCAGGTTCCAG	amp/seq
	R:mdh867: CCGTTTTTCCCAGCAGCAG	amp/seq
<i>pgi</i>	F:pgi1F: GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	amp
	R:pgi1R: CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	amp
	pgi2F: CTGCTGGCGCTGATCGGCAT	seq
	pgi2R: TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT	seq
<i>phoE</i>	F:phoE604.1: ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	amp/seq
	R:phoE604.2: TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	amp/seq

	F:infB1F: CTCGCTGCTGGACTATATTCG	amp
infB	R:infB1R: CGCTTTCAGCTCAAGAATTTC	amp
	infB2F: ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC ia	seq
	F:tonB1F: CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	amp/seq
tonB	R:tonB2R: ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	amp/seq

Abreviaturas. Amp: amplificación; Seq: secuenciación.

Condiciones de amplificación		
Temp.	Tiempo	
94°C	2 min	
94°C	20 seg	¶
55°C	30 seg	35 ciclos
72°C	30 seg	¶
72°C	5 min	
10°C	α	

Fuente: Elaboración propia.

En todos los casos, tras la amplificación de los genes correspondientes, los productos amplificados fueron corridos en una electroforesis en un gel de agarosa LE (Lonza Group) al 1% y al finalizar la electroforesis los productos de PCR fueron escindidos del gel y purificados utilizando el estuche comercial *Pure link* (Invitrogen, USA). Los productos purificados fueron cuantificados utilizando el sistema nanodrop 2000 (*Thermo Scientific, Wilmington, MA*) y enviados a Macrogen para su posterior secuenciación. Posteriormente los resultados de la secuenciación fueron inicialmente

analizados en el software *Codón Code Aligner* (Phred algorithm) para identificar la pureza de las secuencias y posteriormente llevadas para la asignación de alelos y ST a la base de datos (<http://bigsdw.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Para el análisis de la información derivada del MLST y su relación filogenética con los ST reportados a nivel local y mundial, se utilizó goeBURST usando el software PHILoViZ.

Análisis PCR para los genes *bla* acompañantes

Una reacción multiplex por qPCR con sondas *TaqMan* fue utilizada para confirmar la presencia de los genes *bla*_{OXA}, *bla*_{VIM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{IMP}, *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}. Las sondas y cebadores fueron diseñados usando el software Beacon Designer 8.0 (Premier Biosoft International) (Tabla 6). El ADN total fue utilizado como plantilla para la reacción, las concentraciones finales de cebadores y sondas en la reacción fueron de 0,2 µM cada uno. Volumen adicional de Magnesio (1µl [25mM]) y dNTPs (1.5 µl [10mM]) fueron agregados por reacción. Para la reacción de PCR se utilizó el sistema CFX96 (Bio-Rad laboratorios, Hercules, CA). Las condiciones para el multiplex qPCR fueron: 50°C por 2min, 95°C por 2 min, seguidos por 40 ciclos a 95°C (15s) y 60°C (1min). Las muestras con un valor de C_T menor de 35 fueron consideradas positivas.

Una vez identificadas las beta-lactamasas, se determinaron las variantes de las enzimas codificadas en los genes *bla* previamente detectados. Para ello, tras la amplificación de los genes correspondientes, los productos amplificados fueron corridos en una electroforesis en un gel de agarosa LE (Lonza Group, USA) al 1% y al finalizar la electroforesis los productos de PCR fueron escindidos del gel y purificados utilizando el estuche comercial *Pure link* (Invitrogen, USA). Los productos purificados fueron cuantificados utilizando el sistema nanodrop 2000 (*Thermo Scientific, Wilmington, MA*) y enviados a MacroGen para su posterior secuenciación.

Caracterización del entorno genético de los genes *bla*_{KPC}

Para la caracterización del entorno genético de los genes *bla*_{KPC}, se realizó la identificación del *Tn4401* utilizando los cebadores previamente publicados (Tabla 8). Al finalizar el procedimiento de amplificación, los fragmentos fueron cortados del gel y purificados utilizando el estuche comercial *Pure link* (Invitrogen, USA). Los productos purificados fueron cuantificados utilizando el sistema nanodrop 2000 (*Thermo Scientific, Wilmington, MA*) y enviados a un laboratorio externo para su secuenciación. Los resultados de la secuenciación fueron inicialmente analizados en el software *Codón Code Aligner* (Phred algorithm) para identificar la pureza de las secuencias y las variantes de beta-lactamasas fueron identificadas mediante comparación de las secuencias obtenidas con aquellas disponibles en GenBank utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabla 8. Cebadores y sondas utilizados para la detección del entorno genético de *bla*_{KPC}

Nombre	Secuencia	Referencia
KpcA	5'-CTG TCT TGT CTC TCA TGG CC-3'	
KpcB	5'-CCT CGC TGT GCT TGT CAT CC-3'	
4281	5'-GGC ACG GCA AAT GAC TA-3'	
4714	5'-GAA GAT GCC AAG GTC AAT GC-3'	
SeqRlout	5'-ACG ACC ACG CAC GCA CAA AC-3'	
3'EndYC	5'-GCA TCA AAC GGA AGC AAA AG-3'	
3781L	5'-GCT TTC TTG CTG CCG CTG TG-3'	(Naas et al., 2008)
3098U	5'-TGA CCC TGA GCG GCG AAA G-3'	
905L	5'-GCG ACC GGT CAG TTC CTT CT-3'	
816U	5'-CAC CTA CAC CAC GAC GAA CC-3'	
141R-6	5'-TCA CCG GCC CTC ACC TTT GG-3'	
5'endYC	5'-CTT AGC AAA TGT GGT GAA CG-3'	
KPC R	5' - CTCAGTGCTCTACAGAAAACC - 3'	

istB5'R	5'-CTGACCCACTTTACCCCTGA-3'	Este estudio
tnpAKPCF	5'-CGTGTTTCATGATCCGGCTG-3'	Este estudio
tnpAKPCR	5'-TTCATCCGGCGATGATGGTC-3'	Este estudio

Fuente: Elaboración propia.

Caracterización de plásmidos portadores de los genes *bla*

PFGE-S1: Para la caracterización de los plásmidos portadores de genes *bla* en cuanto a tamaño se utilizó PFGE-S1 según la metodología descrita previamente en PFGE, con algunas modificaciones (Barton et al., 1995) Brevemente, se realizó el mismo procedimiento presentado previamente para la preparación de los moldes de PFGE, igualmente, se tomaron 2 mm del molde y fueron sometidos a digestión con una unidad de nucleasa S1 (Takara) en 200 µL de buffer de S1 y finalmente incubados a 55°C por 45 min. La electroforesis se realizó utilizando las siguientes condiciones de corrida: 6 V, 1seg-30seg por 20 horas. Los fragmentos de DNA fueron transferidos a una membrana de nailon cargada positivamente (Roche Diagnostics). La marcación de sondas y la detección se realizó utilizando el estuche comercial *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I* (Roche Diagnostics), según las indicaciones del fabricante.

PFGE-Ceu-I: La localización de los genes *bla* (cromosomal o plasmídica) se confirmó por ensayos de hibridación con sondas específicas para los genes 23S ARNr y *bla* según el protocolo reportado previamente y descrito en PFGE. Rápidamente, el DNA embebido en agarosa se incubará a 37°C durante la noche con una unidad de endonucleasa *I-Ceu-I* en 200 µl de buffer. Al igual que para PFGE-S1 la electroforesis se realizó utilizando las siguientes condiciones de corrida: 6 V, 1seg-30seg por 20 horas. Los fragmentos de DNA fueron transferidos a una membrana

de nailon cargada positivamente (Roche Diagnostics). La marcación de sondas y la detección se realizó utilizando el estuche comercial *DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I* (Roche Diagnostics), según las indicaciones del fabricante.

PCR-replicon typing – PRT: Para la caracterización de los plásmidos asociados a la diseminación de las carbapenemasas, a partir de colonia pura se realizó el proceso de extracción de DNA total utilizando el estuche comercial *UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit*. La identificación de los plásmidos asociados a la presencia de los genes *bla* en *K. pneumoniae*, se realizó utilizando el sistema de tipificación de plásmidos. Los cebadores utilizados y sus condiciones se presentan en la Tabla 9 (Carattoli et al., 2005).

Tabla 9. Cebadores y sondas utilizados para la detección de PCR-replicon typing – PRT

Nombre	Secuencia del cebador	Sitio blanco
HI1 FW	5'-ggagcggatggattacttcagta-3'	parA-parB
HI1 RV	5'-tgccgtttcacctcgtgagta-3'	
HI2 FW	5'-tttctcctgagtcacctgtaaacac-3'	iterons
HI2 RV	5'-ggctcactaccgttgcacatcct-3'	
I1 FW	5'-cgaaagccggacggcagaa-3'	RNAI
I1 RV	5'-tcgtcgttccccaagttcgt-3'	
X FW	5'-aaccttagaggctatttaagttgctgat-3'	ori γ
X RV	5'-tgagagtcaattttatctcatgttttagc-3'	

Diseminación de clones de alto riesgo en K. pneumoniae portadora de carbapenemasa tipo KPC en Colombia

L/M FW	5'-ggatgaaaactatcagcatctgaag-3'	repA, B, C
L/M RV	5'-ctgcagggcgattctttagg-3'	
N FW	5'-gtctaacgagcttaccgaag-3'	repA
N RV	5'-gtttcaactctgccaagttc-3'	
FIA FW	5'-ccatgctggttctagagaagtg-3'	iterons
FIA RV	5'-gtatatccttactggcttccgcag-3'	
FIB FW	5'-ggagttctgacacacgattttctg-3'	repA
FIB RV	5'-ctcccgtcgttcagggcatt-3'	
W FW	5'-cctaagaacaacaagcccccg-3'	repA
W RV	5'-ggtgcgcgcatagaaccgt-3'	
Y FW	5'-aattcaacaacactgtgcagcctg-3'	repA
Y RV	5'-gcgagaatggacgattacaaaacttt-3'	
P FW	5'-ctatggcctgcaaacgcgccagaaa-3'	iterons
P RV	5'-tcacgcgccagggcgagcc-3'	
FIC FW	5'-gtgaactggcagatgaggaagg-3'	repA2
FIC RV	5'-ttctcctcgtcgccaaactagat-3'	
A/C FW	5'-gagaaccaagacaagacctgga-3'	repA
A/C RV	5'-acgacaacctgaattgcctcctt-3'	
T FW	5'-ttggcctgtttgtgcctaaacat-3'	repA
T RV	5'-cgttgattacacttagcttggac-3'	

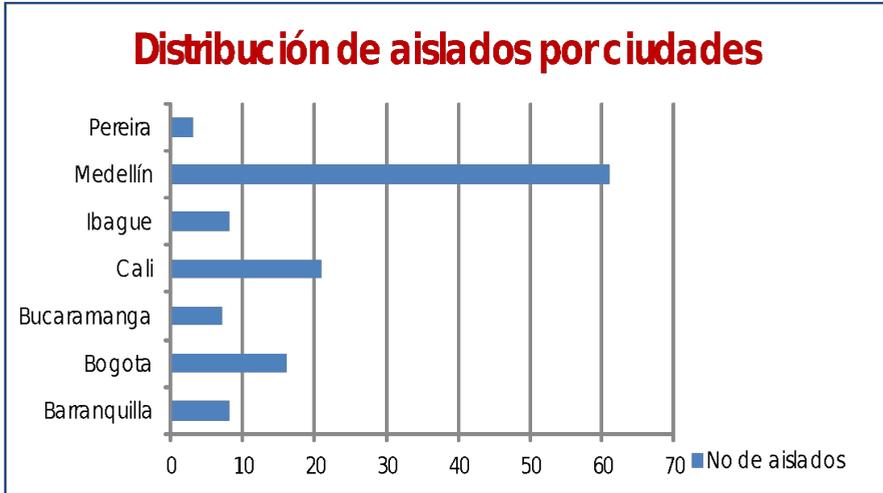
FII₅ FW	5'-ctgtcgttaagctgatggc-3'	repA
FII₅ RV	5'-ctctgccacaacttcagc-3'	
F_{repB} FW	5'-tgatcgттаaggaatttg-3'	RNAI/repA
F_{repB} RV	5'-gaagatcagtcacacccatcc-3'	
K/B FW	5'-gcggtccggaagccagaaaac-3'	RNAI
K RV	5'-tctttcacgagcccgcaaa-3'	
B/O RV	5'-tctcgttccgcaagttcga-3'	RNAI

Fuente: Elaboración propia.

3. Resultados y discusión

Los 124 aislados seleccionados (uno por paciente) fueron recolectados de siete ciudades y once hospitales de tercer nivel entre el 2008 y 2010 (Figura 7). La mayoría de los aislados pertenecían a la ciudad de Medellín, seguidos por Cali y Bogotá. La mayoría de los aislados provenían de pacientes de las unidades de cuidado intensivo (UCI) y las muestras más frecuentes fueron orina (n=42), sangre (n=22) y tracto gastrointestinal (n=36) (Figura 8).

Figura 7. Distribución de aislados de *K. pneumoniae* MDR por ciudades



Fuente: Elaboración propia.

Figura 8. Distribución de aislados de *Klebsiella pneumoniae* MDR por tipo de muestra



Fuente: Elaboración propia.

El resultado de la qPCR confirmó la presencia del gen bla_{KPC} en los 124 aislamientos analizados. Todos los aislados portadores de la carbapenemasa tipo KPC mostraron siete diferentes pulsotipos (PTG) al realizar el análisis por PFGE. Dentro de los PTG encontrados, el PTG5 contiene 85 de los aislados analizados (similitud menor de 75%) pertenecientes a 6/7 ciudades incluidas en el estudio, indicando que estos aislamientos están asociados a una diseminación de tipo clonal en el país. De cada pulsotipo se seleccionó al menos un aislamiento para el análisis de MLST (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de PFGE de *K. pneumoniae*

Pulsotipo	No. De aislados	No. De hospitales	CIUDAD
PTG1	7	2	BOG/MED
PTG2	23	1	MED
PTG3	4	1	MED
PTG4	3	1	BQA
PTG5	85	10	CLO/BOG/IBE/MED/BGA/PEI
PTG6	1	1	MED
PTG7	1	1	CLO

Fuente: Elaboración propia.

Abreviaturas: BOG: Bogotá, MED: Medellín, BQA: Barranquilla, IBE: Ibagué, CLO: Cali, BGA: Bucaramanga, PEI: Pereira.

Para llevar a cabo el análisis de las variantes de la carbapenemasa tipo KPC junto con el estudio de su entorno genético y la presencia de beta-lactamasas acompañantes, se seleccionó al menos un aislamiento por pulsotipo. Las variantes de la carbapenemasas tipo KPC identificadas

fueron KPC-2 y KPC-3. En cuanto al entorno genético del gen bla_{KPC} , se observó la presencia del Tn4401 tanto en la isoforma a como en la b. Cabe anotar que el PTG5 estuvo asociado al gen bla_{KPC-3} en ambas isoformas, mostrando una gran variabilidad (Tabla 11). Similares resultados fueron reportados posteriormente por Rojas et al., al utilizar secuenciación del genoma completo (Rojas et al., 2018).

En cuanto a las beta-lactamasas acompañantes de la enzima KPC, se encontraron enzimas tipo penicilinas TEM-1 y SHV-1, adicionalmente se encontraron beta-lactamasas de espectro extendido tipo CTX-M 12 y 15 y SHV -2, 5, 11, 12, 28 (Tabla 11).

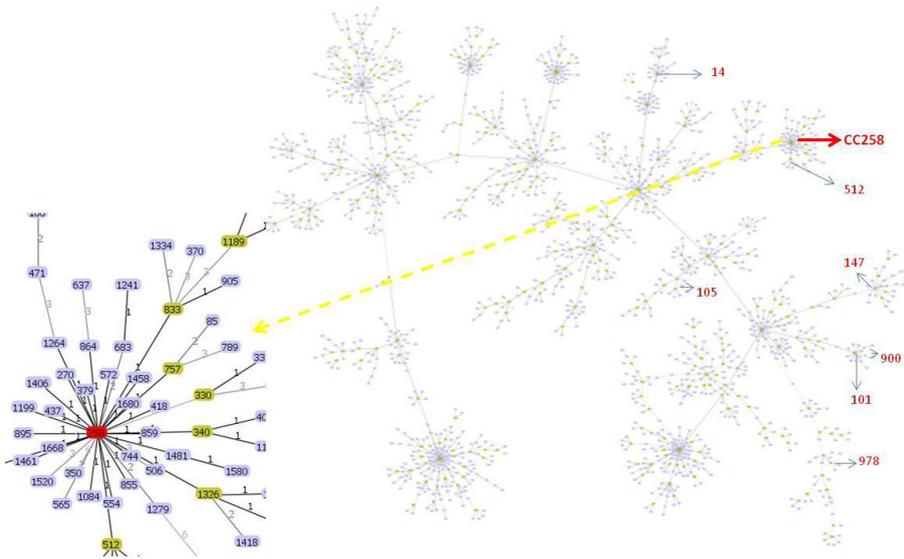
Tabla 11. Tipificación de aislamientos de *K. pneumoniae* MDR seleccionados para análisis de MLST

ID	HOS	Pulsotipo	No aislados	Ciudad	ST	bla _{KPC}	isoforma Tr4401	Enzimasacompañantes	FOT	AXO	P/4	FEP	TAZ	AZT	IMI	ETP	CIP	AMI	TGC	POL
1776	CGN	PTG1	7	BOG/MED	147	KPC-2	b	CTX-M15,SHV-1,TEM-1	>32	>64	>128	16	32	>32	<0.12	1	>8	64	0.5	1
1619	CGN	PTG1		MED	147	KPC-2	b	CTX-M15,SHV-2	>64	>64	128	32	32	>32	<0.5	<0.5	>8	32	0.5	<0.5
2035	HPTU	PTG2	23	MED	14	KPC-2	b	TEM-1	>32	64	128	32	>32	>16	>64	>32	2	32	0.5	<0.5
1542	HPTU	PTG2		MED	14	KPC-2	b	SHV-12	8	<8	256	2	128	>32	2	2	<1	16	0.5	<0.5
772	HPTU	PTG3	4	MED	101	KPC-2	b	SHV-1	16	32	256	8	16	>32	4	4	<1	<8	0.5	2
1327	CGN	PTG4	3	BOA	258	KPC-2	b	SHV-28,TEM-1	<2	32	128	<0.5	<2	<8	<0.5	4	<1	32	0.5	<0.5
869	HPTU	PTG5			512	KPC-3	a	SHV-11,TEM-1	64	>64	>256	128	128	>32	32	128	>8	32	1	2
1091	HPTU	PTG5			512	KPC-3	a	SHV-11	64	>64	>256	128	256	>32	>128	128	>8	32	0.5	<0.5
574	HMC	PTG5		CLO/BOG//IBE/ MED/BGA/PEI	258	KPC-3	b	CTX-M12	32	64	256	16	256	>32	4	8	>8	>64	0.5	1
2267	CFVL	PTG5	85		258	KPC-3	b	SHV-12,TEM-1	>32	>64	>128	32	>32	>32	32	>32	>8	32	1	<0.5
878	HPTU	PTG5			512	KPC-3	a	SHV-11	>64	>64	>256	128	256	>32	64	64	>8	32	0.5	2
789	HFLLA	PTG5			258	KPC-3	a	SHV-12	32	64	>256	8	>256	>32	1	2	>8	32	0.5	2
2039	HPTU	PTG6	1	MED	979	KPC-2	b	SHV-5	16	16	64	2	32	>16	2	4	<0.5	<8	0.5	<0.5
1994	CFVL	PTG7	1	CLO	978	KPC-2	b	SHV-11	8	16	32	8	4	16	64	>32	4	16	4	<0.5

Fuente: Elaboración propia.

Abreviaturas: PTG: Pulsotipo grupo, BOG: Bogotá, PEI: Pereira, MED: Medellín, CLO: Cali, BGA: Bucaramanga, BQA: Barranquilla, IBE: Ibagué, IMI: imipenem, MER: meropenem, AK: Amikacina, AZT: aztreonam, CEP: Cefepime, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, PIP/TAZ: piperacilina/tazobactam, POLB: polimixina.

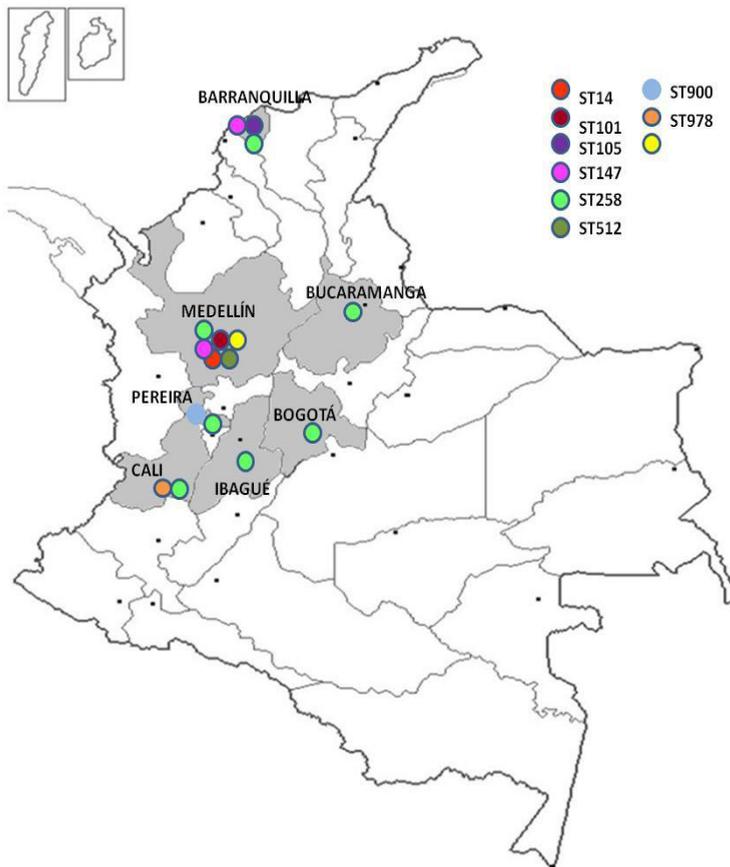
Adicionalmente, los aislados seleccionados para la identificación y secuenciación de beta-lactamasas, fueron utilizados para el análisis de MLST. Los resultados mostraron 8 STs diferentes: ST147, ST512, ST17, ST14, ST101, ST978, ST979 y ST258 (Figura 9).



Fuente: Elaboración propia.

Figura 9. Distribución de los diferentes ST encontrados en *K. pneumoniae* en Colombia. Utilizando goeBURST (PHILOViZ). Se observa una gran variabilidad de STs. La línea amarilla muestra una ampliación del *High risk clone* CC258.

Es importante resaltar la distribución del PTG5 en seis de las siete ciudades del país evaluadas, que, además, es el que contiene el mayor número de aislados. El 66% de ellos eran portadores del gen bla_{KPC-3} y estaban asociados a los ST258 y ST512, ambos pertenecientes al mismo complejo clonal (Figura 10); sin embargo, en las siete ciudades se encontró la presencia del GC258.



Fuente: Elaboración propia.

Figura 10. Diseminación de clones de alto riesgo de *Klebsiella pneumoniae* MDR en Colombia. Se observa la distribución del GC258 (ST258 y ST512) en las 7 ciudades estudiadas.

El GC258 ha sido reconocido a nivel mundial como el principal linaje asociado a la diseminación de KPC (Mathers et al., 2015b; Woodford et al., 2011); sin embargo recientes hallazgos utilizando secuenciación del genoma han confirmado como este ST258 está formado por dos diferentes clados dentro del mismo ST, indicando que estudios adicionales son requeridos para llegar a un mejor entendimiento de esta población (Szijártó et al., 2016). Los demás STs encontrados eran portadores del gen bla_{KPC-2} , y la mayoría de ellos provenían de Medellín, ciudad en la cual fue reportada por primera vez en Colombia esta carbapenemasa. Estos resultados fueron posteriormente confirmados con los análisis realizados por secuenciación del genoma completo incluyendo parte de estos aislados y adicionando aislados de los años 2002 hasta el 2014 mostrando como la diseminación del gen bla_{KPC-2} no solo mostró mayor diversidad de STs; sino que ha sido desplazada por el gen bla_{KPC-3} asociado al GC258 (Ocampo et al., 2016; Rojas et al., 2018).

En cuanto al análisis plasmídico (PRT) se detectó la presencia de los plásmidos tipo Inc B/O, FIC, A/C, PIA, T, W, K/B, FIA, L/M, N, I1 entre los aislados analizados, mostrando una gran variabilidad. En otros estudios se ha mostrado que los plásmidos portadores de bla_{KPC} más comunes son los que pertenecen al complejo de incompatibilidad IncFIIA, IncN e IncA/C, lo cual podría explicar la alta capacidad de diseminación de estas enzimas en Colombia. En un estudio posterior realizado por Rojas y col., confirmaron estos resultados identificando dos formatos de diseminación de *K. pneumoniae* portadora de KPC; una diseminación clonal de KPC-3 asociado al GC258 y una plasmídica de KPC-2 (Rojas et al., 2018).

Aunque *K. pneumoniae* portadora de KPC fue reportada en Colombia por primera vez en el año 2005, en la ciudad de Medellín; desde entonces su expansión a otras enterobacterias y a *Pseudomonas* spp., ha sido exponencial (Correa et al., 2012; Mojica et al., 2012). Inicialmente *K.*

pneumoniae fue encontrada como portadora del gen bla_{KPC-2} ; pero en el 2008 se identificó el supuesto ingreso de bla_{KPC-3} al país asociado a un brote presentado en la ciudad de Medellín en el cual el caso índice fue atribuido a un paciente cuya procedencia era Israel donde ya se había reportado esta variante (Lopez et al., 2011). Sin embargo, estudios posteriores identificaron que KPC-3 estaba circulando en el país desde el año 2007 (Rojas et al., 2018).

Anteriormente en Colombia se habían descrito diferentes STs asociados a la diseminación del gen bla_{KPC} con diferentes contextos genéticos, sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación y la investigación subsiguiente, permiten concluir que la introducción del ST258 generó una expansión clonal para el gen bla_{KPC-3} que comenzó a desplazar el gen bla_{KPC-2} , el cual se asocia más a una alta diseminación plasmídica (Rojas et al., 2018).

4. Agradecimiento

A la líder científica del Grupo de Resistencia Bacteriana perteneciente al Centro Internacional De Entrenamiento e Investigaciones Médicas en donde fue desarrollado este trabajo. Este trabajo fue financiado por Colciencias, Merck S.A y Pfizer.

Bibliografía

- Alós, J.-I. (2015). [Antibiotic resistance: A global crisis]. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Bae, I. K.; Kim, J.; Sun, J. Y. H.; Jeong, S. H.; Kim, Y.-R.; Wang, K.-K. & Lee, K. (2014). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis & repetitive sequence-based PCR methods for molecular epidemiological studies of *Escherichia coli* clinical isolates. *The Indian Journal of Medical Research*, 140(5), 679-685.
- Barton, B. M.; Harding, G. P. y Zuccarelli, A. J. (1995). A general method for detecting and sizing large plasmids. *Analytical Biochemistry*, 226(2), 235-240. <https://doi.org/10.1006/abio.1995.1220>
- Bratu, S.; Landman, D.; Alam, M.; Tolentino, E. y Quale, J. (2005). Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. From Brooklyn, New York. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 776-778. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.776-778.2005>
- Brisse, S.; Fevre, C.; Passet, V.; Issenhuth-Jeanjean, S.; Tournebize, R.; Diancourt, L. & Grimont, P. (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PloS One*, 4(3), e4982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004982>
- Carattoli, A.; Bertini, A.; Villa, L.; Falbo, V.; Hopkins, K. L. & Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 63(3), 219-228. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.03.018>

- Correa, A.; Montealegre, M. C.; Mojica, M. F.; Maya, J. J.; Rojas, L. J.; De La Cadena, E. P.; Ruiz, S. J.; Recalde, M.; Rosso, F.; Quinn, J. P. & Villegas, M. V. (2012). First report of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate coharboring KPC and VIM carbapenemases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(10), 5422-5423. <https://doi.org/10.1128/AAC.00695-12>
- Cuzon, G.; Naas, T.; Truong, H.; Villegas, M. V.; Wisell, K. T.; Carmeli, Y.; Gales, A. C.; Venezia, S. N.; Quinn, J. P. & Nordmann, P. (2010). Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerging Infectious Diseases*, 16(9), 1349-1356. <https://doi.org/10.3201/eid1609.091389>
- Fey, P. D. y Rupp, M. E. (2003). Molecular epidemiology in the public health and hospital environments. *Clinics in Laboratory Medicine*, 23(4), 885-901. [https://doi.org/10.1016/s0272-2712\(03\)00100-8](https://doi.org/10.1016/s0272-2712(03)00100-8)
- Gautom, R. K. (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2977-2980.
- Karampatakis, T.; Antachopoulos, C.; Iosifidis, E.; Tsakris, A. & Roilides, E. (2016). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *Future Microbiology*, 11, 809-823. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0042>
- Ko, K. S.; Lee, J.-Y.; Baek, J. Y.; Suh, J.-Y.; Lee, M. Y.; Choi, J. Y.; Yeom, J.-S.; Kim, Y.-S.; Jung, S.-I.; Shin, S. Y.; Heo, S. T.; Kwon, K. T.; Son, J. S.; Kim, S.-W.; Chang, H.-H.; Ki, H. K.; Chung, D. R.; Peck, K. R. & Song, J.-H. (2010). Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *Journal of Medical Microbiology*, 59(Pt 7), 822-828. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.018119-0>

- Lopez, J. A.; Correa, A.; Navon-Venezia, S.; Correa, A. L.; Torres, J. A.; Briceño, D. F.; Montealegre, M. C.; Quinn, J. P.; Carmeli, Y. & Villegas, M. V. (2011). Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 17(1), 52-56. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03209.x>
- Mathers, A. J.; Peirano, G. y Pitout, J. D. D. (2015). *Escherichia coli* ST131: The quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Advances in Applied Microbiology*, 90, 109-154. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.002>
- Mojica, M. F.; Correa, A.; Vargas, D. A.; Maya, J. J.; Montealegre, M. C.; Rojas, L. J.; Ruiz, S. J.; Quinn, J. P.; Villegas, M. V. & Colombian Nosocomial Bacterial Resistance Study Group. (2012). Molecular correlates of the spread of KPC-producing *Enterobacteriaceae* in Colombia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(3), 277-279. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.05.006>
- Morehead, M. S. y Scarbrough, C. (2018). Emergence of Global Antibiotic Resistance. *Primary Care*, 45(3), 467-484. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.006>
- Naas, T.; Cuzon, G.; Villegas, M.-V.; Lartigue, M.-F.; Quinn, J. P. & Nordmann, P. (2008). Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1257-1263. <https://doi.org/10.1128/AAC.01451-07>
- Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R. A.; Dabos, M. L.; Zavala, A.; Dortet, L.; Retailleau, P. & Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) –

structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 917-919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>

Navon-Venezia, S.; Chmelnitsky, I.; Leavitt, A.; Schwaber, M. J.; Schwartz, D. & Carmeli, Y. (2006). Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 3098-3101. <https://doi.org/10.1128/AAC.00438-06>

Ovalle, M. V.; Saavedra, S. Y.; González, M. N.; Hidalgo, A. M.; Duarte, C. & Beltrán, M. (2017). Results of the national surveillance of antimicrobial resistance of *Enterobacteriaceae* and Gram negative bacilli in health care-associated infections in Colombia, 2012-2014. *Biomédica*, 37(4), 473. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i4.3432>

Podschun, R. y Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589-603.

Poirel, L. y Nordmann, P. (2002). Acquired carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 3(2), 117-127. <https://doi.org/10.2174/1389201023378427>

Robledo, I. E.; Aquino, E. E.; Santé, M. I.; Santana, J. L.; Otero, D. M.; León, C. F. y Vázquez, G. J. (2010). Detection of KPC in *Acinetobacter spp.* In Puerto Rico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 1354-1357. <https://doi.org/10.1128/AAC.00899-09>

Rojas, L. J.; Weinstock, G. M.; De La Cadena, E.; Diaz, L.; Rios, R.; Hanson, B. M.; Brown, J. S.; Vats, P.; Phillips, D. S.; Nguyen, H.; Hujer, K. M.; Correa, A.; Adams, M. D.; Perez, F.; Sodergren, E.; Narechania, A.; Planet, P. J.;

- Villegas, M. V.; Bonomo, R. A. & Arias, C. A. (2018). An Analysis of the Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: Convergence of Two Evolutionary Mechanisms Creates the “Perfect Storm”. *The Journal of Infectious Diseases*, 217(1), 82-92. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix524>
- Samuelsen, Ø.; Naseer, U.; Tofteland, S.; Skutlaberg, D. H.; Onken, A.; Hjetland, R.; Sundsfjord, A. & Giske, C. G. (2009). Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(4), 654-658. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp018>
- Shen, P.; Wei, Z.; Jiang, Y.; Du, X.; Ji, S.; Yu, Y., & Li, L. (2009). Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among *Enterobacteriaceae* in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4333-4338. <https://doi.org/10.1128/AAC.00260-09>
- Solomon, S. L. y Oliver, K. B. (2014). Antibiotic resistance threats in the United States: Stepping back from the brink. *American Family Physician*, 89(12), 938-941.
- Szijártó, V.; Guachalla, L. M.; Hartl, K.; Varga, C.; Banerjee, P.; Stojkovic, K.; Kaszowska, M.; Nagy, E.; Lukasiewicz, J. & Nagy, G. (2016). Both clades of the epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clone ST258 share a modified galactan O-antigen type. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(2), 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2015.12.002>
- Tsakris, A.; Tsioni, C.; Pournaras, S.; Polyzos, S.; Maniatis, A. N. & Sofianou, D. (2003). Spread of low-level carbapenem-resistant *Acinetobacter*

bacter baumannii clones in a tertiary care Greek hospital. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(6), 1046-1047. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg470>

Van Duin, D. y Doi, Y. (2017). The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence*, 8(4), 460-469. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>

Villegas, M. V.; Lolans, K.; Correa, A.; Suarez, C. J.; Lopez, J. A.; Vallejo, M.; Quinn, J. P. & Colombian Nosocomial Resistance Study Group. (2006). First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(8), 2880-2882. <https://doi.org/10.1128/AAC.00186-06>

Woodford, N.; Turton, J. F. y Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 736-755. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>

Yigit, H.; Queenan, A. M.; Anderson, G. J.; Domenech-Sanchez, A.; Biddle, J. W.; Steward, C. D.; Alberti, S.; Bush, K. & Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1151-1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>