

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* y *bla_{GES}*
PROVENIENTES DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *ENTEROBACTERALES*
PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS**

Paola Andrea Lucumi Mosquera

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CALI
2025**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* y *bla_{GES}*
PROVENIENTES DE AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE *ENTEROBACTERALES*
PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS**

INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN

**Requisito parcial para la obtención del título de
Magíster en Ciencias Biomédicas**

Paola Andrea Lucumi Mosquera

Código: 2100184

Director:

Claudia Cristina Paredes Amaya, MSc, PhD

Co-Director:

Lorena Matta Cortés, MD, MSc.

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CALI
2025**

EDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mi familia, cuya paciencia, apoyo y amor incondicional han sido mi mayor fuente de inspiración. Cada logro alcanzado ha sido posible gracias a ustedes. Su confianza en mí me ha permitido superar momentos difíciles y continuar adelante con determinación. Esta dedicación es un pequeño tributo a todo lo que han hecho por mí. Gracias por ser mi pilar y mi guía en este viaje académico.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi grupo de investigación, cuyos esfuerzos y colaboración incansable han sido fundamentales para la realización de esta tesis. Su dedicación y pasión por la ciencia me han inspirado y motivado a lo largo de este proceso.

A mis profesores, agradezco enormemente por compartir su conocimiento y sabiduría, y por guiarnos con paciencia y compromiso. Cada lección impartida ha sido una pieza clave en mi formación académica y en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros, gracias por el apoyo y camaradería. La colaboración y el intercambio de ideas que hemos mantenido han enriquecido este proyecto y han sido una fuente constante de ánimo y motivación.

Finalmente, a mi familia, cuyo amor incondicional ha sido mi fuerza y mi refugio en todo momento. Su apoyo ha sido indispensable para alcanzar este logro.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	8
GLOSARIO.....	9
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	4
3. MARCO CONCEPTUAL.....	6
3.1 Los carbapenémicos y sus mecanismos de acción.....	6
3.2 Mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos.....	8
3.3 Visión mundial carbapenemasas.....	15
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 Objetivo general.....	17
4.2 Objetivos específicos.....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1 Tipo de estudio.....	18
5.2 Área de estudio.....	18
5.3 Población y muestra.....	18
5.4 Criterios de selección.....	18
5.5 Variables de estudio.....	19
5.6 Aprobación comité de ética.....	19
5.7 Identificación y pruebas de susceptibilidad:.....	19
5.8 Identificación fenotípica del tipo de carbapenemasa.....	20
5.9 Extracción de ADN bacteriano por método de ebullición directa.....	21
5.10 Amplificación de genes mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	21
5.11 Visualización de los productos de PCR por electroforesis.....	22
5.12 Purificación productos DNA.....	23
5.13 Secuenciación de Sanger.....	23
5.14 Secuenciación multilocus (MLST).....	23
5.15 Determinación de variante por análisis bioinformático:.....	25
5.16 Análisis estadístico.....	25

6.	RESULTADOS.....	26
6.1	Identificación y determinación del perfil de susceptibilidad	26
6.2	Determinación del tipo de carbapenemasa por métodos fenotípicos	29
6.3	Secuenciación de Sanger.....	34
6.4	Secuenciación multilocus (MLST)	36
7.	DISCUSIÓN	39
8.	CONCLUSIONES	51
9.	PERSPECTIVAS	52
10.	ANEXOS	53
11.	REFERENCIAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Componentes pared celular bacterias Gram negativas.	7
Figura 2. Inhibición proceso de transpeptidación mediado por carbapenémico (Elaboración propia).....	7
Figura 3 Clasificación carbapenemasas (Elaboración propia)	9
Figura 4 Estructura KPC.	12
Figura 5. Estructura NDM.....	14
Figura 6 Procedimiento prueba de detección de carbapenemasas Test® CARBA-5.	20
Figura 7 Perfil de resistencias cepas estudio.....	28
Figura 8. Gel electroforesis Imagen A y B: Amplificación positiva gen bla _{KPC}	29
Figura 9 Amplificación positiva gen bla _{NDM}	30
Figura 10 Amplificación gen bla _{GES}	31

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Variables de estudio.....	19
Tabla 2. Variantes detectadas por prueba Test® CARBA-5.	20
Tabla 3. Oligonucleótidos para amplificar la región codificante de los genes bla _{KPC} , bla _{NDM} y bla _{GES}	21
Tabla 4. Resultado de identificación bacteriana.....	26
Tabla 5. Perfil de resistencia cepas estudio.....	27
Tabla 6. Aislamientos positivos para KPC	29
Tabla 7. Aislamientos positivos para NDM	31
Tabla 8. Aislamientos positivos para coproducciones (KPC/NDM).....	32
Tabla 9. Resultados cromatografía y PCR de aislamientos de estudio	32
Tabla 10. Resultado prueba de Kappa de Cohen	33
Tabla 11. Resultados variantes KPC aislamientos de estudio	34
Tabla 12. MLST para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	36
Tabla 13. ST asociado a carbapenemasas en aislamiento <i>K. pneumoniae</i>	37
Tabla 14. Resultado MLST <i>Escherichia coli</i>	38
Tabla 15. ST asociado a carbapenemasas en aislamiento <i>E. coli</i>	38

GLOSARIO

Antibiograma: Prueba de laboratorio utilizada para determinar la sensibilidad o resistencia de bacterias frente a diferentes antibióticos.

Aislamiento clínico: Cepa bacteriana obtenida de una muestra biológica de un paciente con fines diagnósticos o de investigación.

β -lactamasa: Enzima producida por algunas bacterias que degrada antibióticos β -lactámicos, como penicilinas y cefalosporinas.

***bla_{KPC}*:** Gen que codifica para la carbapenemasa tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), una enzima que confiere resistencia a los antibióticos carbapenémicos.

***bla_{NDM}*:** Gen que codifica para la metalo- β -lactamasa NDM (New Delhi metallo- β -lactamase), una enzima que confiere resistencia a un amplio rango de antibióticos, incluyendo carbapenémicos.

***bla_{GES}*:** Gen que codifica para la β -lactamasa GES (Guiana Extended Spectrum), que puede presentar actividad carbapenemasa dependiendo de la variante.

Carbapenemasas: Enzimas producidas por bacterias que hidrolizan carbapenémicos, un grupo de antibióticos de amplio espectro.

Clonalidad: Relación genética entre cepas bacterianas que comparten un origen común.

DNA (ácido desoxirribonucleico): Molécula portadora de la información genética en los seres vivos.

Enterobacterales: Orden de bacterias Gram negativas que incluye patógenos clínicamente relevantes como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp.*

Electroforesis en gel de agarosa: Técnica utilizada para separar fragmentos de ADN o ARN según su tamaño molecular mediante un campo eléctrico.

Fenotipo: Conjunto de características observables de un organismo, determinadas por su genotipo y el ambiente.

Genotipo: Conjunto de genes de un organismo que determina características específicas.

Genes de resistencia: Secuencias de ADN que confieren a las bacterias la capacidad de sobrevivir a la acción de los antibióticos.

Integrones: Elementos genéticos móviles que capturan y expresan genes, incluyendo genes de resistencia antibiótica.

Metalo- β -lactamasas (MBL): Enzimas que requieren iones metálicos, como el zinc, para hidrolizar antibióticos β -lactámicos.

MIC (Concentración inhibitoria mínima): Concentración mínima de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano

Multirresistencia: Capacidad de un microorganismo para resistir la acción de múltiples antibióticos.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Técnica de biología molecular utilizada para amplificar fragmentos específicos de ADN.

Plásmido: Elemento genético extracromosómico que puede transferirse entre bacterias y a menudo porta genes de resistencia antibiótica.

Resistencia bacteriana: Capacidad de las bacterias para sobrevivir la acción de uno o más antibióticos.

Secuenciación de ADN: Proceso de laboratorio para la determinación del orden de los nucleótidos en una molécula de ADN.

Transposones: Elementos genéticos móviles que pueden saltar de un lugar a otro dentro del genoma y que a menudo transportan genes de resistencia a antibióticos.

Variantes genéticas: Diferencias en la secuencia de ADN entre individuos o poblaciones, que pueden influir en la funcionalidad de genes o proteínas.

Virulencia: Capacidad de un microorganismo para causar enfermedad en un hospedador.

Zonas de inhibición: Áreas claras alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma, que indican sensibilidad bacteriana al antibiótico.

RESUMEN

El aumento de la resistencia a los antibióticos convencionales ha impulsado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para mitigar el creciente impacto de las enfermedades infecciosas en la morbilidad y mortalidad. A nivel mundial, las bacterias productoras de carbapenemasas representan un grave problema de salud pública, debido a su capacidad de inactivar los carbapenémicos, que se consideran como la última línea de tratamiento frente a infecciones graves. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* y *bla_{GES}* en aislamientos de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas obtenidos de un hospital regional en la ciudad de Cali. Para ello, se emplearon técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar los genes que codifican las enzimas KPC, NDM y GES, los cuales fueron secuenciados por Sanger y analizados mediante herramientas bioinformáticas para identificar las variantes genéticas de cada enzima. Los resultados proporcionaron datos clave sobre los mecanismos genéticos responsables de la resistencia a los antibióticos carbapenémicos.

Summary

The rise of resistance to conventional antibiotics has spurred the search for new therapeutic alternatives to mitigate the growing impact of infectious diseases on morbidity and mortality. Globally, carbapenemase-producing bacteria represent a serious public health problem due to their ability to inactivate carbapenems, which are considered the last line of treatment for severe infections. This study aims to characterize the *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, and *bla_{GES}* genes in carbapenemase-producing *Enterobacterales* isolates obtained from a regional hospital in the city of Cali. Molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) were employed to amplify the genes encoding KPC, NDM, and GES enzymes, which will then be sequenced using Sanger sequencing and analyzed with bioinformatics tools to identify the genetic variants of each enzyme. The results provided key data on the genetic mechanisms responsible for resistance to carbapenem antibiotics.

Carbapenemasas; Resistencia antimicrobiana; Enterobacterales; bla_{KPC}; bla_{NDM}; bla_{GES};
PCR (Reacción en cadena de la polimerasa); Secuenciación Sanger; Bioinformática;
Epidemiología molecular

1. INTRODUCCIÓN

Desde la década de 1990, la resistencia a los antimicrobianos ha sido una preocupación creciente para los profesionales de la salud, debido al aumento de aislamientos bacterianos multirresistentes que desafían el tratamiento y el desarrollo de políticas públicas para su control. (1,2). A nivel mundial, las bacterias productoras de carbapenemasas, como los *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos (ERC), son un foco de atención debido a que resisten la acción de los antibióticos de última línea, lo que las convierte en una amenaza significativa para la salud pública. Las infecciones causadas por estos patógenos están asociadas con una alta morbilidad y mortalidad, prolongación de la estancia hospitalaria, discapacidad en los pacientes (1), y altos costos para el sistema de salud (2,3).

Las causas del aumento de la resistencia bacteriana son multifactoriales e incluyen el uso masivo e inadecuado de antimicrobianos en la industria agropecuaria, así como en el tratamiento de enfermedades infecciosas en humanos y animales, además de las deficiencias en el control de infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) (4).

La resistencia a los antibióticos carbapenémicos está mediada por múltiples mecanismos como, la producción de carbapenemasas, la sobreexpresión de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y cefalosporinas AmpC, junto con alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular (5).

Las carbapenemasas, codificadas en plásmidos, son las más preocupantes por su capacidad de diseminar la resistencia. El gen *bla_{KPC}*, que codifica una β -lactamasa de clase A tipo serina denominada "*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa", está asociado al transposón Tn4401, lo que facilita su dispersión geográfica y transferencia inter-especie. La enzima KPC ha sido identificada en más de 100 secuenciotipos (ST), pero su propagación global está vinculada al grupo clonal CG258, especialmente ST258 y sus variantes ST11, ST340 y ST512, presentes en Europa, América y Asia (6,7). El transposón que contiene *bla_{KPC}*, se ha encontrado en una gran variedad de plásmidos transferibles, incluidos plásmidos pertenecientes a los grupos de incompatibilidad

IncFIIK, IncA/C, IncN, IncI2, IncX, IncR y ColE. Además, los plásmidos que albergan *bla_{KPC}* también codifican resistencia a otros antimicrobianos como quinolonas, aminoglucósidos y sulfonamidas (8). De acuerdo con la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica "NCBI" (National Center for Biotechnology Information), actualmente se han descrito 223 variantes de KPC (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#KPC> consultado 2025-02-18) (4). Las dos variantes más frecuentes son KPC-2 y KPC-3 (que difieren en un solo aminoácido) y los *Enterobacterales* productores de KPC muestran una alta resistencia debido a que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenémicos (9). Otro grupo relevante de carbapenemasas incluye a las β -lactamasas GES (del inglés, Guiana extended-spectrum), descubiertas en el año 2000 con la identificación de GES-1 en un aislado de *Klebsiella pneumoniae*. Hasta la fecha, se han descrito 64 variantes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#GES> consultado 2025-02-18) (9,10). Algunas enzimas GES como GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14 y GES-18 pueden hidrolizar imipenem (9,11), y se han detectado en bacterias Gram negativas, principalmente en géneros como *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, y en menor proporción en *Enterobacterales*, donde las variantes GES-4, GES-5 y GES-6 son las más comunes. Los genes *bla_{GES}* suelen estar localizados en integrones de clase I presentes en plásmidos transferibles, aunque también se ha reportado su presencia en cromosomas de algunas especies de *Enterobacterales* (8).

Por su parte, la metalo- β -lactamasa NDM (del inglés, New Delhi metallo- β -lactamase), identificada en 2008 en un paciente con infección urinaria (12,13), ha demostrado una rápida diseminación a nivel mundial, particularmente en *Enterobacterales* y *Acinetobacter spp* (13). Actualmente, se han descrito 75 variantes de NDM (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#NDM> consultado 2025-03-18). En *Enterobacterales*, el gen *bla_{NDM}* está mayoritariamente ubicado en plásmidos de los grupos de incompatibilidad IncL/M, IncA/C, IncF e IncHI1, lo que facilita su diseminación entre géneros bacterianos. Además, el gen *bla_{NDM}* se encuentra comúnmente asociado a la secuencia de inserción ISAb125, que forma parte del transposón Tn125, presente en el cromosoma de *Acinetobacter baumannii* (13,14). Las cepas que portan *bla_{NDM}* en

plásmidos suelen coproducir otras β -lactamasas, como oxacilinasas, BLEE, o carbapenemasas adicionales. NDM ha sido detectada en todos los continentes, con mayor prevalencia en India y Pakistán, siendo actualmente la metalo- β -lactamasa más prevalente a nivel global (15).

En Colombia, desde 2012, el Sistema Nacional de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana ha monitoreado las IAAS, emitiendo informes epidemiológicos regionales sobre los perfiles de resistencia bacteriana más prevalentes. Los datos recopilados entre 2012 y 2014 revelaron la endemidad de KPC en el país y el aumento de las coproducciones con NDM. Según los informes más recientes, la región del Valle del Cauca, Antioquia y Santander han reportado una alta prevalencia de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas, destacándose *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}* como los genes predominantes en los aislamientos hospitalarios (4,16,17). Sin embargo, existe una necesidad urgente de caracterizar de manera más profunda los perfiles genéticos de resistencia en estos patógenos para comprender mejor la dinámica de propagación y su impacto en los desenlaces clínicos. Por ello en este estudio nos planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué variantes de los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* y *bla_{GES}* están presentes y cuáles son los linajes clonales predominantes de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en aislamientos de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas provenientes de un hospital regional de la ciudad de Cali?

2. JUSTIFICACIÓN

Los *Enterobacterales* productores de carbapenemasas (EPC) han emergido en Colombia como una seria amenaza para la salud pública. Aunque la *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) ha sido históricamente la carbapenemasa más frecuentemente identificada, desde 2011 se ha observado un aumento en la prevalencia de la New Delhi Metallo- β -lactamasa (NDM), especialmente en aislamientos con coproducciones KPC-NDM, lo que evidencia un nuevo desafío clínico y epidemiológico(18)

El informe de vigilancia de resistencia antimicrobiana en IAAS de 2018 señaló que la carbapenemasa endémica en Colombia es KPC, principalmente en *Enterobacterales*, y en particular en *Klebsiella pneumoniae*, donde el 25,5% de los aislamientos presentó resistencia a carbapenémicos, posicionándola como uno de los patógenos prioritarios para la vigilancia epidemiológica. Además, se destacaron otros microorganismos relevantes como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para 2020, el Laboratorio de Vigilancia de Resistencia Antimicrobiana reportó que las coproducciones de carbapenemasas representaban el 7,3% de los aislamientos, siendo la combinación KPC/NDM la más frecuente, con un 53,5% de los casos, identificada en 15 de los 22 departamentos que enviaron aislamientos a los sistemas de vigilancia (19,20).

Un estudio descriptivo de De La Cadena et al, basado en datos recopilados mediante WHONET entre enero de 2018 y diciembre de 2021, mostró que entre 2018 y 2019, *E. coli* fue la principal causa de infecciones en unidades de cuidados intensivos (UCI). No obstante, entre 2020 y 2021, *K. pneumoniae* pasó a ocupar el primer lugar. La resistencia a carbapenémicos atribuida a la presencia de enzimas carbapenemasas fue del 16% en salas de hospitalización general y del 17,2% en las UCI de adultos, lo que evidencia una mayor incidencia en áreas de atención crítica (21).

La vigilancia de las carbapenemasas es de suma importancia debido a que estas enzimas inactivan antimicrobianos catalogados como de importancia crítica para la salud humana por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esto las convierte en una grave amenaza para la salud pública, dadas sus elevadas tasas de morbilidad y mortalidad, la

limitación de opciones terapéuticas y su rápida diseminación. En este contexto, la detección precoz y la vigilancia activa se mantienen como estrategias esenciales para combatir la resistencia antimicrobiana.(4,21,22)

Con el fin de mitigar la rápida propagación de las carbapenemasas entre bacterias, es imperativo profundizar en el conocimiento sobre su epidemiología, características moleculares y repercusiones clínicas (2,3). Por tanto, esta investigación se propone como objetivo la caracterización genética de las enzimas carbapenemasas, con el propósito de generar información que sirva como base para el desarrollo de protocolos, guías y estrategias de vigilancia y control epidemiológico en la región.

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1 Los carbapenémicos y sus mecanismos de acción

Los antibióticos betalactámicos son fundamentales en las decisiones terapéuticas, especialmente frente a infecciones causadas por bacilos Gram negativos. Sin embargo, la aparición de enzimas capaces de degradar el anillo betalactámico ha disminuido significativamente su eficacia y eficiencia (2). Ante este desafío, la industria farmacéutica desarrolló los carbapenémicos, una subclase de betalactámicos con un núcleo fusionado a un anillo insaturado de cinco átomos, lo que le confiere mayor resistencia a la acción de las betalactamasas y reduce su tasa de degradación (2,23).

Los carbapenémicos son usados para tratar las infecciones causadas por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas (24). El primer carbapenémico descrito fue la tienamicina, producido en 1976, con acción frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, aerobios y anaerobios (25). Los carbapenémicos tienen un efecto letal independiente de la concentración sobre las bacterias (25). Su mecanismo de acción está dirigido hacia el último paso de la síntesis del peptidoglicano, la transpeptidación, proceso en el cual con ayuda de enzimas transpeptidasas o también denominadas proteínas de unión a penicilina (PBP), que se encuentran en el espacio periplásmico, forman el peptidoglicano; los betalactámicos incluyendo los carbapenémicos, tienen similitud estructural con la D-Alanina, un residuo terminal del peptidoglicano, por lo cual logran unirse de forma irreversible a las PBP imposibilitando la formación de enlaces cruzados peptídicos, lo que impide la correcta formación de la pared bacteriana, provocando agujeros que conducen a la salida del material y finalmente a la muerte celular (25) (figura 1 y 2).

Pared celular Gram negativa

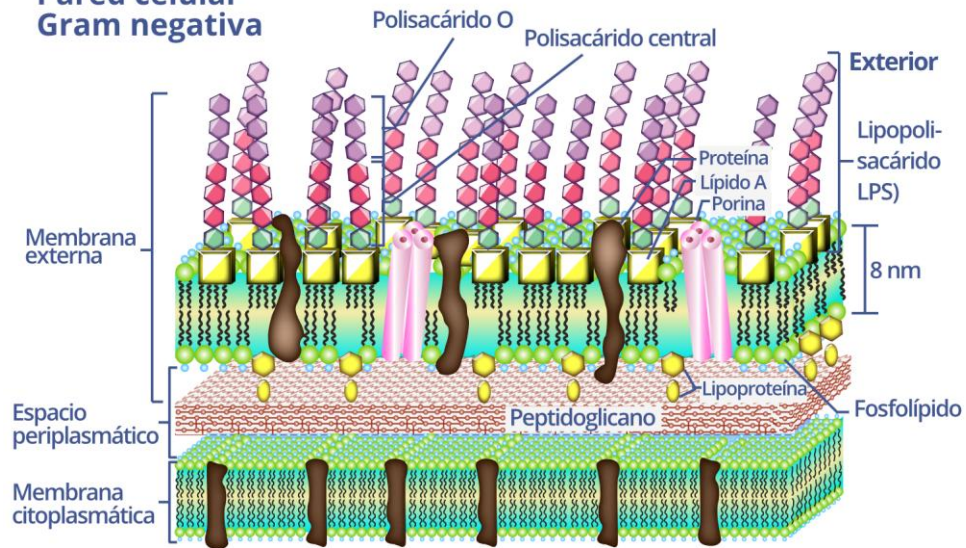


Figura 1. Componentes pared celular bacterias Gram negativas. Morales, N. (2018). Diferenciando Bacterias Gram Positivo (+) y Gram Negativo (-) Mediante Tinción de Gram. Unidades de Apoyo para el Aprendizaje. CUAED/FES Iztacala-UNAM.

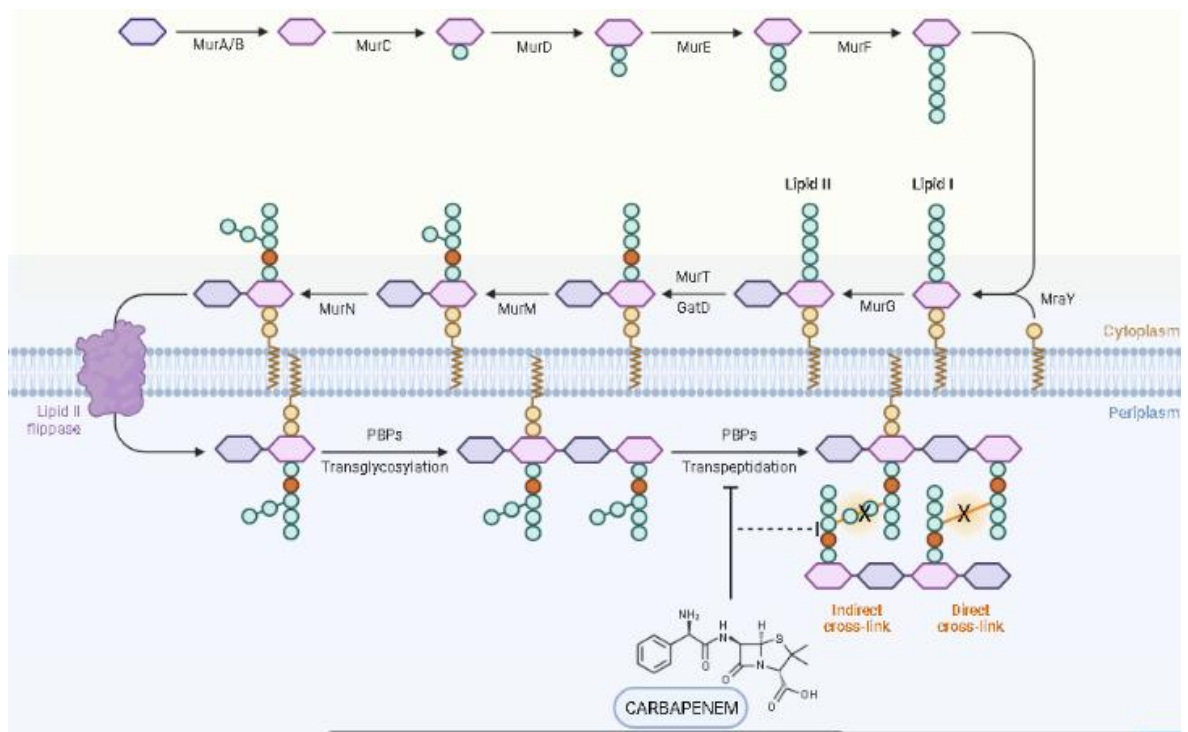


Figura 2. Inhibición proceso de transpeptidación mediado por carbapenémico (Elaboración propia)

3.2 Mecanismos de resistencia a los antibióticos carbapenémicos

Las bacterias tienen un gran arsenal de mecanismos para resistir la acción de los antibióticos carbapenémicos, los más conocidos y frecuentes son (25):

Alteraciones en el lugar de acción: Modificación específica en el sitio diana y lugar de acción donde se une el antibiótico.

Disminución de la permeabilidad: Modificación en porinas y canales que reducen o inhabilitan la entrada al antibiótico generando resistencia.

Bomba de expulsión: Sistemas complejos dependientes de energía (ATP o fuerza protón motriz) que están dispuestos en la membrana citoplasmática expulsando el antibiótico.

Inactivación o modificación enzimática: Utilización de enzimas para realizar modificaciones en el antibiótico agregando grupos fosfato, acetilo o adenilo que lo inactivan y no permiten su unión a la célula diana.

Enzimática: Por hidrólisis enzimática del anillo β -lactámico, que inactiva al antibiótico antes de su unión con las PBP.

La degradación enzimática es el mecanismo de resistencia más relevante en bacterias gramnegativas y uno de los más preocupantes, debido a su capacidad para facilitar la propagación de genes de resistencia. La alta promiscuidad bacteriana, junto con la frecuente asociación de elementos móviles como transposones e integrones, acelera la diseminación de estos genes tanto en entornos hospitalarios como comunitarios (2,25,26). Entre los patógenos de mayor preocupación se encuentran los EPC, que producen carbapenemasas como KPC, VIM, IMP, NDM y OXA-48, las cuales están implicadas en una proporción significativa de las morbilidades y mortalidades a nivel mundial.(2,5). Un estudio de Villegas et al. sobre bacteriemias causadas por *Enterobacterales* en siete países de América Latina reportó una mortalidad global del 37%. Esta cifra fue cuatro veces mayor en pacientes con EPC, en comparación con aquellos infectados por cepas sensibles a carbapenémicos (18,27)

Carbapenemasas

La carbapenemasas son enzimas producidas por bacilos Gram negativos como *Enterobacterales* y bacilos no fermentadores, (*Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*). Tienen la capacidad de hidrolizar el núcleo betalactámico de los carbapenémicos creando resistencia a los mismos.

Tipos de carbapenemasas

Estas enzimas pueden clasificarse según su mecanismo de adquisición en dos tipos: cromosómicas, como KPC, SME, NMC e IMI, y plasmídicas, como KPC y GES. Adicionalmente, se agrupan en función del residuo presente en su sitio activo: algunas contienen serina, mientras que otras dependen del ion zinc para su actividad enzimática. Esta clasificación es crucial, ya que determina tanto el mecanismo de acción como la eficacia de los inhibidores disponibles (figura 3) (28–30)

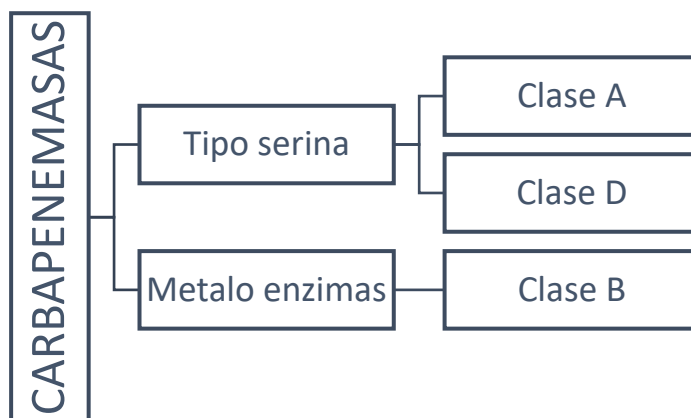


Figura 3 Clasificación carbapenemasas (Elaboración propia)

Carbapenemasa tipo serina: Se caracterizan por presentar una serina en el sitio activo del núcleo del anillo betalactámico (31); en este grupo se encuentran las carbapenemasas de clase A y clase D.

Clase A: Pueden ser betalactamasas cromosómicas y plasmídicas. Estas enzimas son inhibidas por los nuevos inhibidores de betalactamasas como avibactam y relebactam. Dentro del grupo de las cromosómicas se encuentran la carbapenemasa no metalocromosómica tipo A (NMC-A), la enzima *Serratia marcescens* (SME), la

betalactamasa hidrolizante de imipenem (IMI), *Serratia fonticola* carbapenemasa (SFC), la *Klebsiella* carbapenemasa de Brazil (BKC), la Carbapenemasa de Bicêtre (BIC) y la Imipenemasa francesa (FRI).(5)

Dentro del grupo de las codificadas por plásmidos se encuentra a KPC (Carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae*) y GES (Guiana espectro extendido).

KPC: Estas enzimas fueron reportadas por primera vez en 1996, a partir de un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* en Carolina del Norte, Estados Unidos (8). Desde entonces, las bacterias productoras de KPC se han diseminado globalmente, con 223 variantes identificadas hasta la fecha, siendo KPC-2 y KPC-3 las más prevalentes. Este grupo de enzimas genera gran interés clínico-epidemiológico, no solo por su alta frecuencia, sino también por la coproducción frecuente con otras carbapenemasas, generalmente metalcarbapenemasas como VIM y NDM, lo que complica aún más el panorama clínico y dificulta el tratamiento efectivo (32).

En América Latina, las bacterias productoras de KPC se han detectado en varios países, incluidos México, Panamá, Puerto Rico y Cuba (5). Su expansión se ve facilitada por la transferencia horizontal, mediada principalmente por el transposón Tn4401, y la diseminación clonal del linaje ST258 (4,33).

El gen *bla_{KPC}* codifica para la serinbetalactamasa *Klebsiella pneumoniae*. La transmisión de *bla_{KPC}* puede ocurrir a través de diversos procesos, tales como propagación clonal, plásmidos y elementos genéticos móviles pequeños, como el transposón Tn4401 (10,34). El Tn4401 es un transposón basado en Tn3 con una longitud de 10 Kb, que termina mediante dos genes de transposasa Tn3 (*tnpA*) y resolvasa Tn3 (*tnpR*), y dos secuencias de inserción ISKpn6 e ISKpn7 (10,35). El gen *bla_{KPC}* es transportado por más de 40 plásmidos pertenecientes a diferentes grupos de incompatibilidad (Inc) como A/C, ColE, FIA, I2, IncFII, L/M, N, P, R, U, W y X. Estos plásmidos portadores de *bla_{KPC}* también acarrean numerosos genes de resistencia a los antimicrobianos (36).

El plásmido pKpQ1 es uno de los portadores del gen *bla_{KPC}* más estudiados. Este elemento genético móvil y varios de sus derivados, asociados principalmente con *Klebsiella pneumoniae* ST258, se han identificado en Israel, Italia y América del Norte

desde 2006 (10). *K. pneumoniae* ST258 ha desempeñado un papel crucial en la diseminación global de las enzimas KPC, particularmente de las variantes KPC-2 y KPC-3. Aunque ST258 ha sido el clon dominante, se han reportado otras cepas de *K. pneumoniae* y diversas especies de enterobacterias productoras de KPC en diferentes regiones del mundo (37,38). Actualmente, los aislados productores de KPC son considerados endémicos en varios países de América, incluidos algunos estados de América del Norte, así como en Colombia, Brasil y Argentina. En Europa, Italia y Grecia se destacan como países endémicos, mientras que, en otros, como España y Francia, se han registrado casos esporádicos, algunos vinculados a la importación de aislados de zonas endémicas. En Asia, Israel y China son los países más afectados, mientras que en India se han notificado aislados productores de KPC de manera ocasional, al igual que en Australia, Nueva Zelanda y África continental (34,38,39).

Las variantes de KPC se han encontrado en animales domésticos, de granja y salvajes. Köck et al. (2018) revisaron casi 70 artículos que muestran genes que codifican para KPC en aves y carne de pollo. También se encontraron en diversas fuentes ambientales, especialmente acuáticas, como un molusco en Túnez o aguas residuales en Austria y Brasil. Aunque no se puede descartar el origen humano, estos hallazgos sugieren una difusión global de la KPC (40).

Las enzimas KPC son proteínas de 293 aminoácidos en promedio, con un peso molecular de 32 kDa. Están compuestas de dos subdominios y el plegamiento general es similar al observado en otras betalactamasas de clase A (13,56). El primer subdominio está compuesto de 8 hélices alfa, y el segundo está compuesto de 5 láminas beta antiparalelas flanqueadas por 3 hélices alfa (56, 57). Estos dos dominios comparten interacciones electrostáticas, y los puentes de hidrógeno estabilizan la estructura. El sitio activo, ubicado en un bolsillo en la interfaz, contiene el residuo catalítico S70 y el agua de desacilación, que se activa al interactuar con E166, N170 y S70

Un desafío reciente que ha impactado las políticas de salud pública en relación con la resistencia antimicrobiana es la aparición de resistencia a ceftazidima-avibactam (CAZ-AVI). Entre los mecanismos de resistencia estudiados se encuentran mutaciones en el

gen *bla_{KPC}*, la sobreexpresión de este gen, y la pérdida de porinas. (1)Independientemente del mecanismo, la emergencia de resistencia a CAZ-AVI genera una mayor preocupación debido a las complicaciones que impone sobre las opciones terapéuticas disponibles (41).

Estructura KPC

Estructuralmente, las enzimas KPC constan de dos subdominios, un subdominio es principalmente α - helicoidal, mientras que el otro contiene una lámina β de cinco cadenas, flanqueada por α -hélices (figura 4) (42). La hendidura, que se encuentra entre los subdominios, alberga el sitio activo que incluye los residuos S70 y E166, esenciales para la catálisis (42). Es adyacente a esta serina del sitio activo donde se posiciona el grupo carbonilo y se hidroliza el anillo β -lactámico (42). El sitio activo está rodeado por tres bucles: el bucle Ω , que contiene los residuos R164 a D179, el bucle entre las hélices α 3 y α 4, donde se localiza el residuo W105 y un tercer bucle, también definido como la "región bisagra".

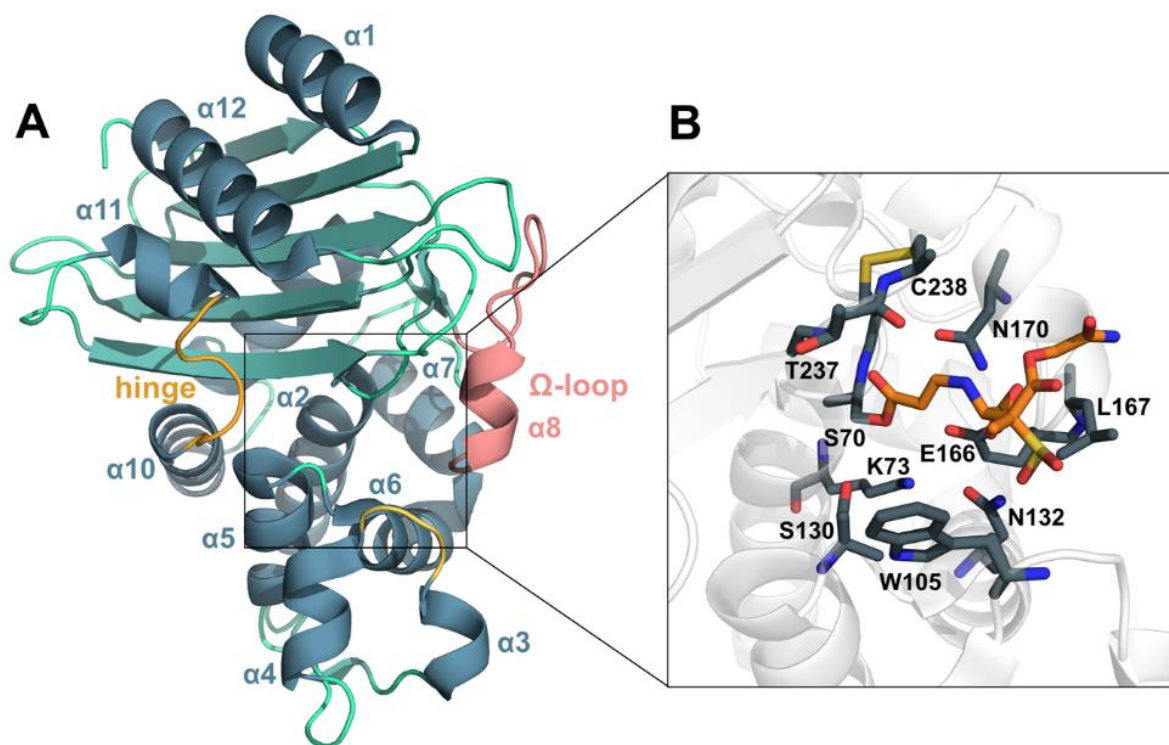


Figura 4 Estructura KPC. <https://www.nature.com/articles/s41598-018-31176-0>

GES: Su primera caracterización fue la variante: GES-1 (28,43), se ha informado en países de Latinoamérica como Colombia, Argentina, Brasil y México (5), pero también tiene presencia hasta el sudeste asiático, pasando por Europa e incluso Sudáfrica. Su hallazgo no es tan frecuente como el de otras carbapenemasas, aunque se han aislado prácticamente en todo el mundo (43), pero se reconoce que se tiene un subreporte en el país debido a que no se busca de manera rutinaria en el laboratorio. En la actualidad se conocen 64 variantes en la enzima GES, a lo largo del tiempo se han ido describiendo nuevas variantes, pero hoy se sabe que solo cuatro cuentan con actividad carbapenemasa: GES-2, GES-4, GES-5 y GES-6 (28). En *Pseudomonas aeruginosa* se han detectado las variantes GES-2 y GES-5 (43).

Clase D: Su representante es la Oxacilinasas, originaria de *Shewanella* spp, puede ser tanto plasmídica como cromosómica, y se dividen en grupos; OXA-23, OXA-245, OXA-58, OXA-72, OXA-143 y OXA-48, siendo esta última la de mayor importancia. Generalmente se encuentra en cepas de *Acinetobacter* spp, pero también puede presentarse en *Enterobacterales* en menor proporción (5,25,28).

Clase B: Las metalobetalactamasas son un grupo diverso de enzimas que dependen de los iones Zn^{2+} en su sitio catalítico, siendo este el responsable del ataque al núcleo del anillo betalactámico (31). Las enzimas de clase B no son inhibidas por los inhibidores de β -lactamasa pero no pueden hidrolizar el aztreonam, por lo que, en ausencia de otros mecanismos de resistencia, el aztreonam es activo como terapia antibiótica. Dentro de este grupo se encuentran las enzimas VIM, NDM e IMP; la más importante en la clínica, por ser mundialmente la más frecuente epidemiológicamente es VIM, pero en Colombia la más predominante es NDM (5).

NDM: Presenta actualmente 75 variantes, y su característica enzimática se debe a la capacidad de hidrolizar la mayoría de betalactámicos, pero no a los monobactámicos (5). Su primera identificación fue la NDM-1 detectada en Nueva Delhi. Posteriormente, se han encontrado cepas productoras de NDM en varias especies de *Enterobacterales* spp., *Acinetobacter* spp. y *Pseudomonas* spp., en todo el mundo, provocando graves infecciones con alta tasas de mortalidad (44). Aunque se están realizando múltiples

esfuerzos para contener esta amenaza, las bacterias productoras de NDM siguen expandiéndose y resultan una amenaza para la salud pública debido que no hay ningún tratamiento contra las NDM aprobado para uso clínico (28,29,31,43).

Estructura NDM

Las metalohidrolasas/oxidoreductasas presentan el característico pliegue sándwich $\alpha\beta/\beta\alpha$ (45,46). Las MBL poseen un surco de sitio activo poco profundo con uno o dos iones de zinc divalentes, bordeado por bucles flexibles (figura 5). En NDM-1, este bucle de horquilla flexible se desplaza sobre el ion de zinc para la hidrólisis y se elimina tras la catálisis (45). El sitio Zn1 está compuesto por los residuos His116, His118 e His196, mientras que el sitio Zn2 está formado por los residuos Asp120, Cys221 e His263 (46). Ambos iones Zn(II) son esenciales y están implicados en el mecanismo de hidrólisis de los antibióticos β -lactámicos (45).

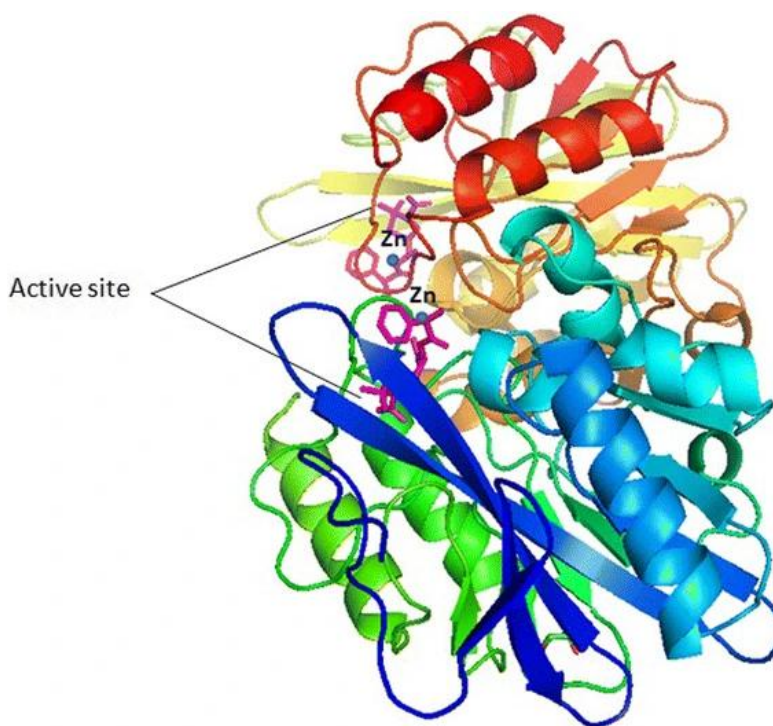


Figura 5. Estructura NDM. <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-017-1012-8>

3.3 Visión mundial carbapenemasas

Las carbapenemasas de clase B solían ser las más frecuentes a nivel mundial, con presencia destacada en países como China, Japón y Australia, donde la carbapenemasa más comúnmente detectada era IMP (31). Sin embargo, con el paso de los años, la distribución de estas enzimas ha cambiado, dando lugar a la predominancia de las carbapenemasas de clase A, como KPC, la cual es endémica en países como Estados Unidos, Grecia e Italia (31). Por otro lado, las β -lactamasas de clase D, como OXA, se encuentran generalmente en *Acinetobacter baumannii* y, en menor medida, en *Enterobacterales*, especialmente las derivadas de OXA-48, que son endémicas en Turquía, Francia, Bélgica y el norte de África (31).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) monitorea la resistencia a carbapenémicos a través de la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) (47). En su informe de 2021, se señaló que desde 2010, muchos países de la región han reportado un incremento sostenido en la prevalencia de aislamientos resistentes a carbapenémicos, superando el 60% en algunos casos. En América Latina, la carbapenemasa más común en *Enterobacterales* es KPC, presente en toda la región, seguida de NDM, con menor presencia de IMP y VIM. En Argentina se describe que durante el periodo de mayo a noviembre de 2020, la coproducción de KPC y NDM es la combinación de carbapenemasas más prevalente, con un 16% entre las enterobacterias resistentes a carbapenémicos recibidas en el laboratorio nacional de referencia; en el caso de Uruguay se observó un aumento de aislamientos productores de KPC y NDM de 3.3% en el periodo enero 2020 y mayo 2021. Por otro lado, en Ecuador se alertó sobre los primeros aislamientos coproductores de KPC y NDM y de KPC y OXA-48 a principios de 2021 (47).

En Colombia, se ha documentado una amplia variedad de carbapenemasas, y la coproducción de estas enzimas en *Enterobacterales* es cada vez más común, como en otros países de América Latina (5). La carbapenemasa tipo KPC es endémica en el país, y su coproducción con NDM ha sido descrita al igual que en Brasil, India, Grecia, China y Alemania (4). Los registros del Grupo para el Control de la Resistencia Bacteriana en Bogotá (GREBO) muestran un aumento en las coproducciones y coexpresiones de

carbapenemasas KPC y NDM (4). Debido a la naturaleza plasmídica de los genes que codifican estas enzimas y su fenotipo multirresistente, el riesgo de diseminación es elevado, lo que limita las opciones terapéuticas en el país (5).

El informe de 2018 sobre infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) indica que en Colombia, la carbapenemasa endémica es KPC, mayormente asociada a *Klebsiella pneumoniae*, con un 25.5% de los aislamientos resistentes a carbapenémicos. Este microorganismo es de alta relevancia para la vigilancia epidemiológica, seguido por *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Alerta Epidemiológica: Emergencia e Incremento de Nuevas Combinaciones de Carbapenemasas En Enterobacterales En Latinoamérica y El Caribe - 22 Octubre 2021 - OPS/OMS). Estos datos coinciden con el estudio del Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (GLASS), que prioriza la vigilancia de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos, debido a su fuerte asociación con la morbilidad y la criticidad de los pacientes (44).

Ante este panorama, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado fortalecer la vigilancia epidemiológica e implementar investigaciones para detectar y caracterizar los mecanismos de resistencia a los carbapenémicos, a fin de tomar medidas oportunas que prevengan su transmisión y permitan el desarrollo de guías y protocolos para su contención (49).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* y *bla_{GES}* e identificar los linajes clonales de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* en aislamientos de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas provenientes de un hospital regional de la ciudad de Cali.

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar la presencia de los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* y *bla_{GES}* en las especies de *Enterobacterales* aisladas.
2. Determinar las variantes de los genes *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}* encontrados en las cepas aisladas.
3. Analizar la diversidad clonal de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

Estudio descriptivo de corte transversal

5.2 Área de estudio

Microbiología básica, clínica y molecular

5.3 Población y muestra

La población corresponde a cuarenta (40) cepas bacterianas aisladas a partir de muestra de hisopados rectales, provenientes de un macroproyecto financiado por convocatoria interna interinstitucional Universidad del Valle -Pontificia Universidad Javeriana Cali código C.I.1940, con acta de aprobación del comité de ética No.003-022. Las cepas fueron obtenidas en un hospital de tercer nivel de la ciudad de Santiago de Cali en el periodo comprendido entre julio del 2022 y abril del 2023.

5.4 Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Aislamientos de hisopados rectales de *Enterobacterales* con resultados de pruebas de susceptibilidad que indiquen resistencia a carbapenémicos de acuerdo con los puntos de corte del CLSI 2022.

Criterios de exclusión

- Aislamientos provenientes de hisopados rectales diferentes a *Enterobacterales*.
- Aislamientos provenientes de hisopados rectales de *Enterobacterales* con resultados de pruebas de susceptibilidad que indiquen sensibilidad a carbapenémicos de acuerdo con los puntos de corte del CLSI 2022.

5.5 Variables de estudio

Las variables listadas en la tabla 1 fueron empleadas en la presente investigación

Tabla 1. Variables de estudio

Variable	Definición teórica	Definición operativa	Tipo de variable	Tipo de escala	Valores posibles	Método de recolección
Especie de enterobacteria aislada	Bacteria aislada perteneciente al orden <i>Enterobacterales</i>	Bacteria identificada a nivel de género y especie por métodos fenotípicos	Cualitativa	Nominal	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Citrobacter</i> sp. <i>Enterobacter</i> Sp. Otras	Resultados de identificación bacteriana
Tipo de carbapenemasa	Enzima producida por cepa de <i>Enterobacter</i> aislada	Tipo de enzima detectada por PCR en las cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas	Cualitativa	Nominal	KPC	Reacción en cadena de la polimerasa, PCR de punto final. Prueba Inmunocromatográfica
					NDM	
					GES	
Variantes de carbapenemasa	Mutación de genes que codifican carbapenemasas	Variante de detectada por secuenciación de Sanger	Cualitativa	Nominal	KPC 1-225	Secuenciación de Sanger
					NDM 1-64	

5.6 Aprobación comité de ética

Esta propuesta fue aprobada por el comité de ética de la Universidad del Valle con el aval código E 048-024 del 21 de octubre de 2024.

5.7 Identificación y pruebas de susceptibilidad:

Los perfiles de susceptibilidad e identificación fueron determinados usando los sistemas automatizados BD Phoenix™ M50. El instrumento BD Phoenix™ M50 determina el crecimiento mediante un indicador de óxido-reducción y la detección de crecimiento por turbidez.(50)

5.8 Identificación fenotípica del tipo de carbapenemasa

La identificación fenotípica se llevó a cabo utilizando la prueba inmunocromatográfica comercial NG-Test® CARBA-5, una prueba rápida de inmunoensayo diseñado para la detección de las cinco carbapenemasas de mayor prevalencia mundial (31), KPC, OXA, VIM, IM P y NDM. La prueba incluye anticuerpos monoclonales específicos contra KPC, OXA, VIM, IMP y NDM en la almohadilla reactiva. Durante la migración de la muestra a lo largo de la placa, las enzimas son captadas y detectadas en las zonas demarcadas de la prueba correspondientes a K, O, V, I y N (figura 6). La colonia bacteriana utilizada se obtuvo a partir de un medio de cultivo sólido de agar LB (medio Luria-Bertani), tras 18 horas de incubación. (48)

La prueba se realizó siguiendo el procedimiento brindado por el inserto (**Anexo 1**)

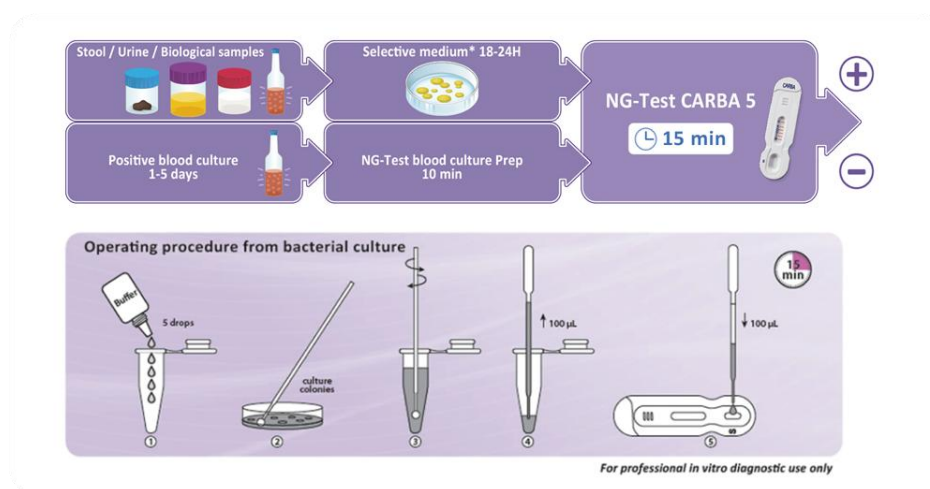


Figura 6. Procedimiento prueba de detección de carbapenemasas Test® CARBA-5.
<https://www.ngbiotech.com/ng-test-carba-5/#1668380143436-90ed1833-3e7d>

Las variantes detectadas por la prueba se encuentran listadas en la tabla 2 (51):

Tabla 2. Variantes detectadas por prueba Test® CARBA-5.

TIPO	VARIANTE
NDM	1 -2 -3 -4 -5 -6 -7 -8 -9 -11 -19
KPC	1 -2 -3 -4 -5 -6 -7 -12 -14 -23 -28 -39

IMP	1 -2 -4 -5 -6 -7 -8 -10 -11 -13 -14 -15 -16 -18 -19 -22 -26 -29 -31 -37 -39 -46 -47 - 56 -58 -61 -63 -71 -79
VIM	1 -2 -4 -5 -6 -19 -23 -26 -27 -31 -39 -46 - 51 -52 -54 -56 -58 -59
OXA	48 -162 -181 -204 -232 -244 -245 -370 - 436 -484 -515 -517 -519 -535 -793

<https://www.ngbiotech.com/ng-test-carba-5/#1668380143436-90ed1833-3e7d>.

5.9 Extracción de ADN bacteriano por método de ebullición directa

Utilizando el protocolo modificado de Shin et al. se realizó la extracción de DNA con el siguiente procedimiento(52):

- Disolver una (1) colonia aislada proveniente de un cultivo de agar solido del medio LB con un crecimiento de 18 horas a un vial estéril con 50uL de agua grado biología molecular
- Calentar a 95°C por diez minutos (10min) utilizando baño seco
- Centrifugar a 13000rpm por cinco minutos (5min)
- Trasladar sobrenadante a un vial estéril nuevo
- Congelar a 4°C hasta momento de uso

5.10 Amplificación de genes mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

El ADN extraído de las cepas de *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos se descongeló para confirmar mediante PCR, la producción de enzimas carbapenemasas. La PCR es una técnica molecular que permite la amplificación de regiones específicas de ADN (53) mediante ciclos controlados de desnaturalización, alineación (o anillamiento) y extensión (54). Las PCR se realizaron con la enzima ADN polimerasas GoTaq® G2 Flexi de Promega (Francia), utilizando los oligonucleótidos listados en la tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos para amplificar la región codificante de los genes bla_{KPC}, bla_{NDM} y bla_{GES}

Nombre del gen	Secuencia del oligo 5'-3'	Peso esperado (pb)	Referencia
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-F ATGTCAGTGTATCGCCGTCT KPC-R TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	893	(55)
<i>bla_{NDM}</i>	NDM-F GGTGGGCGATCTGGTTTTC NDM-R CGGAATGGCTCATCACGATC	621	(56)
<i>bla_{GES}</i>	GES- F ATGCGCTTCATTACGCAC GES- R CTATTGTCCGTGCTCAGG	863	(57)

Para la amplificación del gen *bla_{KPC}* se utilizó el protocolo de Schechner et al. con las siguientes condiciones: 15 min a 95 °C y 38 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 62 °C y 1 min a 72 °C, seguido de un paso de extensión de 10 min a 72 °C (55). Para el control positivo de la prueba se utilizó la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705. Por su parte, para la amplificación del gen *bla_{NDM}* se utilizó el protocolo de Poirel et al. con las siguientes modificaciones: 10 min a 94°C y 36 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 60 °C y 1 min a 72 °C, seguido de un paso de extensión final por 5 min a 72 °C (56). Para el control positivo de la prueba se utilizó la cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA2146; y para la determinación del gen *bla_{GES}* se utilizó el protocolo de Tiemtoré et al. con las siguientes condiciones: 7 min a 94°C y 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 58 °C y 1 min a 72 °C, seguido de un paso de extensión final por 10 min a 72 °C (57). Como control positivo de la prueba se utilizó la cepa de aislamiento clínico de *Acinetobacter baumannii* complex positiva para GES.

5.11 Visualización de los productos de PCR por electroforesis

Los productos amplificados mediante PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en un sistema horizontal, utilizando un voltaje constante de 100 V. Para la visualización del ADN, se empleó el colorante fluorescente SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™), un tinte no tóxico y seguro para la detección de ácidos nucleicos bajo luz azul o ultravioleta. El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo descrito por Poirel et al., asegurando condiciones óptimas para la resolución de fragmentos de ADN amplificados. El tamaño de los productos se determinó mediante la comparación con el marcador de peso molecular 100bp Plus Opti-DNA Marker de ABM®, que permitió corroborar la amplificación específica de las regiones génicas objetivo.

5.12 Purificación productos DNA

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados con el estuche comercial DNA Clean & Concentrator (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.13 Secuenciación de Sanger

Los productos purificados fueron enviados a la institución externa para ser secuenciados mediante la metodología de Sanger, que se basa en la replicación selectiva del ADN mediada por polimerasas en presencia de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs). Los ddNTPs carecen del grupo hidroxilo 3' en la desoxirribosa, lo que impide la formación de enlaces fosfodiéster y, por ende, detiene la síntesis de la cadena de ADN. Cuando se incorporan aleatoriamente en la secuencia en crecimiento, generan fragmentos de ADN de diferentes longitudes que terminan en el nucleótido correspondiente al ddNTP (58,59).

5.14 Secuenciación multilocus (MLST)

La secuenciación multilocus es una técnica de tipificación molecular que utiliza secuencias de múltiples genes esenciales para identificar y caracterizar aislados bacterianos (60). En este estudio, se enviaron los aislados de las cepas bacterianas a una institución externa especializada para realizar la amplificación y secuenciación de los genes conservados. La metodología MLST se basa en la amplificación y secuenciación de fragmentos específicos de genes housekeeping, los cuales son generalmente conservados en las especies y presentan una variabilidad suficiente para discriminar entre diferentes cepas bacterianas (60).

Se realizó la tipificación de secuencias multilocus amplificando y secuenciando, en el caso de los aislados de *Klebsiella pneumoniae* (61), los siguientes siete genes conservados: *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*, de acuerdo con www.pubmlst.org (11):

- ***gapA* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase):** Este gen codifica para una enzima clave en la glucólisis y ha sido ampliamente utilizado en estudios de MLST debido a su función esencial y baja tasa de mutación.
- ***infB* (translation initiation factor 2):** Es crucial para la iniciación de la traducción en bacterias y es otro gen ampliamente utilizado en estudios de MLST.

- ***mdh* (malate dehydrogenase):** Participa en el ciclo del ácido cítrico, siendo fundamental para la respiración celular aeróbica.
- ***pgi* (phosphoglucose isomerase):** Participa en la conversión de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato en la vía glucolítica.
- ***phoE* (phosphate transport system):** Es responsable del transporte de fosfato en la célula y está involucrado en la adaptación bacteriana a condiciones de bajo fosfato.
- ***rpoB* (RNA polymerase β -subunit):** Codifica la subunidad principal de la ARN polimerasa y es una proteína clave para la transcripción de genes.
- ***tonB* (TonB-dependent receptor):** Participa en el transporte de hierro y otras moléculas a través de la membrana externa de la bacteria.

Para los aislados de *Escherichia coli*, Se realizó MLST de siete genes de acuerdo con el protocolo MLST estandarizado para *E. coli*, y con la Enterobase <https://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>, los genes utilizados para la secuenciación fueron (62):

- ***adk* (adenylate kinase):** Este gen participa en el metabolismo energético celular, esencial para la regulación de los niveles de ATP.
- ***fumC* (fumarate hydratase C):** Es parte del ciclo de Krebs y es importante para la producción de energía celular.
- ***gyrB* (DNA gyrase B subunit):** Codifica una subunidad de la ADN girasa, una enzima clave en la superenrollación del ADN durante la replicación.
- ***icd* (isocitrate dehydrogenase):** Participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs), esencial para la respiración celular.
- ***mdh* (malate dehydrogenase):** Similar al caso de *Klebsiella pneumoniae*, también se utiliza en *E. coli* debido a su función central en la metabolización de compuestos intermedios del ciclo de Krebs.
- ***purA* (phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase):** Es clave en la biosíntesis de purinas.

- **recA (recombinase A):** Participa en la reparación del ADN y en la recombinación genética, siendo crucial para la estabilidad genética de las bacterias.

5.15 Determinación de variante por análisis bioinformático:

Las secuencias obtenidas por secuenciación de Sanger, de los genes que codifican para las enzimas KPC y NDM fueron editadas manualmente en el programa de Geneious® 7.1.3, después fueron alineadas utilizando el programa MEGA versión 11 y analizadas con BLAST. Por último, se determinaron las variantes de la enzima usando el programa ResFinder (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>).

5.16 Análisis estadístico

Las variables se presentaron en forma de números absolutos y porcentajes, esquematizados mediante tablas de registro, así como gráficos circulares y barras para facilitar la interpretación visual de resultados.

Adicionalmente se realizaron pruebas de concordancia kappa de cohen entre resultados de las pruebas moleculares (PCR) y la prueba fenotípica (inmunocromatografía) para evaluar la correlación de resultados.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación y determinación del perfil de susceptibilidad

En este estudio se analizaron 40 cepas de *Enterobacterales*. Los resultados de la identificación fenotípica realizada por el método automatizado BD Phoenix™ M50 se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Resultado de identificación bacteriana

BACTERIA	CANTIDAD	PORCENTAJE (%)
<i>Citrobacter farmeri</i>	1	2,5
<i>Citrobacter freundii</i>	1	2,5
<i>Citrobacter koseri</i>	1	2,5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	2,5
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	5	12,5
<i>Escherichia coli</i>	5	12,5
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	2,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	5,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	50
<i>Proteus mirabilis</i>	1	2,5
<i>Providencia rustigianii</i>	1	2,5
<i>Serratia maracenses</i>	1	2,5
Total	40	100

El 50% de las cepas correspondieron a *Klebsiella pneumoniae*, lo que indica que esta especie es la más prevalente en la población, seguida por *Escherichia coli*, y el complejo *Enterobacter cloacae*, cada uno con una representación del 12.5%.

Las especies como *Citrobacter spp.*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella oxytoca*, constituyen un porcentaje más pequeño, cada una representando solo el 2.5% del total de las cepas analizadas.

Los perfiles de susceptibilidad a Meropenem (MEM), Imipenem (IMP), Ertapenem (ETP), Ceftazidima/Avibactam (CAZ/AVI), Ceftriaxona (CRO) y Cefepime (CEP) fueron determinados usando el sistema automatizado BD Phoenix™ M50. En la tabla 5, se detalla el perfil de resistencia presentado por las cepas en estudio:

Tabla 5. Perfil de resistencia cepas estudio

N°	Bacteria	ANTIBIOGRAMA											
		CEP		CRO		IMI		MEM		ERT		C/A	
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	>8	R	>16	R	>1	R		NR
5	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	2	S	>4	R	4	R	4	R	>1	R		NR
18	<i>Escherichia coli</i>	4	I	>4	R	8	R	2	I	>1	R		NR
21	<i>Klebsiella oxytoca</i>	>16	R	>4	R	8	R	>16	R	>1	R		NR
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	>8	R	8	R	>1	R		NR
30	<i>Escherichia coli</i>	16	R	>4	R	>8	R	>16	R	>1	R		NR
31	<i>Citrobacter freundii</i>	>16	R	>4	R	>8	R	>16	R	>1	R	>8/4	R
65	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<=1	S	<=0,12	S	2	I	<=0,5	S	>1	R	0,5/4	S
79	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	<=1	S	<=0,12	S	4	R	1	S	>1	R	1/4ug	S
85	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R		NR	>8	R	16	R	>1	R	>8/4	R
92	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<=1	S	>4	R	1	S	<0,5	S	>1	R	0,5/4	S
95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	>8	R	>16	R	>1	R	>8/4	R
94	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<=1	S	>4	R	1	S	<0,5	S	>1	R	1/4ug	S
101	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	>16	R	>4	R	4	R	2	I	>1	R	<=0,25/4	S
108	<i>Enterobacter aerogenes</i>	>16	R	>4	R	>8	R	>16	R	>1	R	2/4ug	S
111	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	>8	R	>16	R	>1	R	4/4ug	S
116	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	8	R	>16	R	>1	R	2/4ug	S
121	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	8	R	>16	R	>1	R	>8/4	R
122	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	8	R	>16	R	>1	R	4/4ug	S
126	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	8	R	>16	R	>1	R	4/4ug	S
127	<i>Providencia rustigianii</i>	>16	R	>4	R	8	R	>16	R	>1	R		NR
130	<i>Klebsiella oxytoca</i>	>16	R	>4	R	8	R	8	R	>1	R	>8/4	R
136-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		NR	>4	R	1	S	2	I	>1	R	0,5/4	S
136-2	<i>Escherichia coli</i>	>16	R	>4	R	8	R	32	R	>1	R	<=0,25/4	S
159	<i>Proteus mirabilis</i>	>16	R	>4	R		NR	>16	R	>1	R	>8/4	R
171	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	4	R	2	I	>1	R	0,5/4	S
172	<i>Enterobacter cloacae</i>	>16	R	>4	R	8	R	>16	R	>1	R	>8/4	R
173-1	<i>Klebsiella aerogenes</i>	>16	R	>4	R	8	R	>16	R	>1	R	>8/4	R
173-2	<i>Escherichia coli</i>		NR	>4	R	1	S	<=0,5	S	>1	R	<=0,25/4	S
175	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	4	R	8	R	>1	R	4/4ug	S
182	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	8	R	>16	R	>1	R	2/4ug	S
187	<i>Citrobacter koseri</i>	>16	R		NR	2	I	2	I	>1	R	0,5/4	S

189-1	<i>Escherichia coli</i>	>16	R	>4	R	>8	R	8	R	>1	R	>8/4	R
189-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	I	>4	R	8	R	>16	R	>1	R	1/4ug	S
192	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	>8	R	>32	R	>1	R	>8/4	R
203	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	1	S	<=0,5	S	>1	R	0,5/4	S
204-1	<i>Serratia maracenses</i>	<=1	S	>4	R	>8	R	4	R	>1	R		NR
204-2	<i>Enterobacter cloacae</i>	>16	R	>4	R	>8	R	4	R	>1	R	<=0,25/4	S
211	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	>16	R	>4	R	>8	R	>16	R	>1	R	>8/4	R
219	<i>Citrobacter farmeri</i>	>16	R	>4	R	>8	R	>16	R	>1	R	>8/4	R

La interpretación de los resultados sigue los criterios CLSI **S (Sensible)**: Efectividad del antibiótico, **I (Intermedio)**: Eficacia potencial con dosis altas, **R (Resistente)**: Inadecuado para tratamiento, **NR**: No reportado/no determinado. El perfil de susceptibilidad incluye seis agentes antimicrobianos clave: Meropenem (MEM) - Carbapenémico de amplio espectro; Imipenem (IMP) - Otro carbapenémico esencial en infecciones severas; Ertapenem (ETP) - Carbapenémico de uso en infecciones comunitarias y hospitalarias; Ceftazidima/Avibactam (CAZ/AVI) - Combinación para tratar infecciones causadas por Enterobacterales resistentes; Ceftriaxona (CRO) - Cefalosporina de tercera generación; Cefepime (CEP) Cefalosporina de cuarta generación.

En la figura 7, se representa gráficamente el perfil de susceptibilidad para las cepas analizadas.

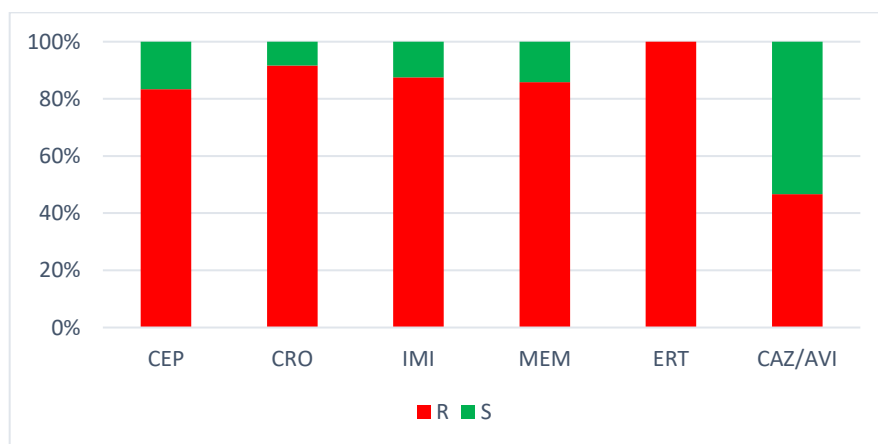


Figura 7 Perfil de resistencias cepas estudio

6.2 Determinación del tipo de carbapenemasa por métodos fenotípicos

Cada uno de los aislamientos fue analizado por PCR para detectar el tipo de carbapenemasa. En la figura 8 y 9 se muestran las bandas asociadas a la amplificación de KPC y NDM de los 40 aislamientos

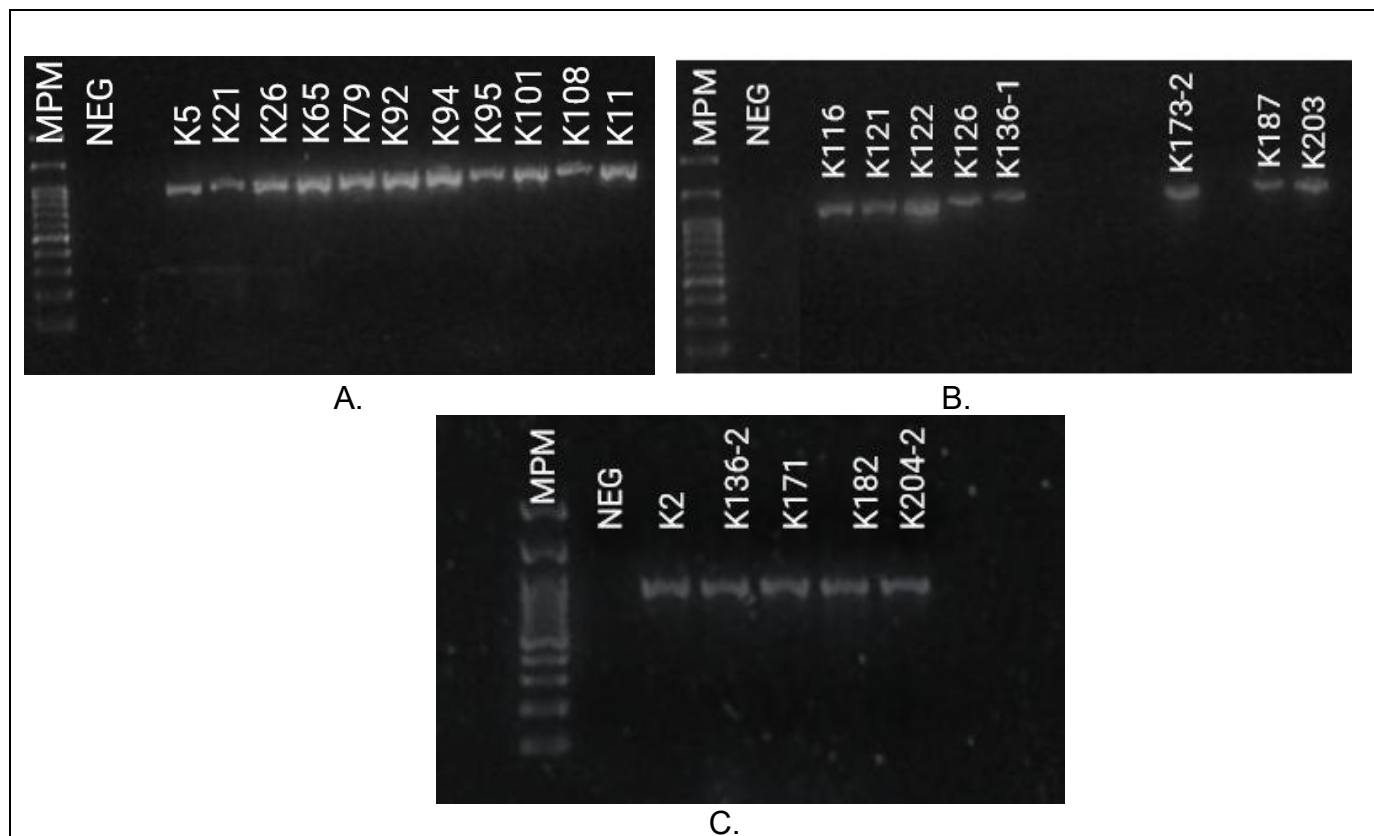


Figura 8. Gel electrophoresis Imagen A y B: Amplificación positiva gen *bla*_{KPC}.

Los aislamientos positivos para KPC, corresponden al 66.7% y se encuentran detallados en la tabla 6

Tabla 6. Aislamientos positivos para KPC

N°	Bacteria	KPC
K2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K5	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	X
K21	<i>Klebsiella oxytoca</i>	X
K26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K65	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K79	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	X
K92	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X

K94	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K101	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	X
K108	<i>Enterobacter aerogenes</i>	X
K111	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K116	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K121	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K122	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K126	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K136-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K136-2	<i>Escherichia coli</i>	X
K171	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K173-2	<i>Escherichia coli</i>	X
K182	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K187	<i>Citrobacter koseri</i>	X
K189-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K203	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
K204-2	<i>Enterobacter cloacae</i>	X

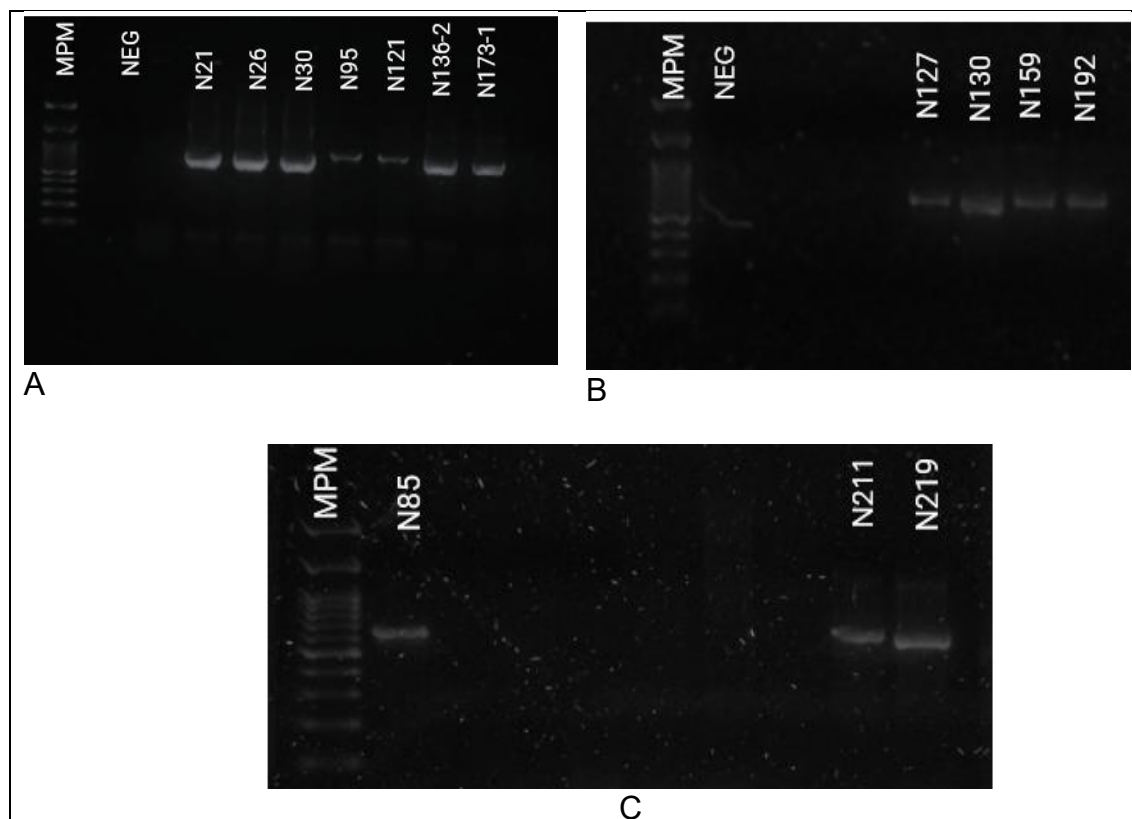


Figura 9 Amplificación positiva gen *bla*_{NDM}

Los aislamientos positivos para NDM corresponden al 43.6% y se detallan en la tabla 7.

Tabla 7. Aislamientos positivos para NDM

N°	Bacteria	NDM
N2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
N21	<i>Klebsiella oxytoca</i>	X
N26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
N30	<i>Escherichia coli</i>	X
N85	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
N95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
N121	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
N127	<i>Providencia rustigianii</i>	X
N130	<i>Klebsiella oxytoca</i>	X
N136-2	<i>Escherichia coli</i>	X
N159	<i>Proteus mirabilis</i>	X
N173-1	<i>Klebsiella aerogenes</i>	X
N189-1	<i>Escherichia coli</i>	X
N192	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
N211	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X
N219	<i>Citrobacter farmeri</i>	X

Todos los aislamientos fueron analizados por PCR para la búsqueda del gen *bla_{GES}* que codifica para la enzima GES, pero no se obtuvieron aislamientos positivos para ese gen.

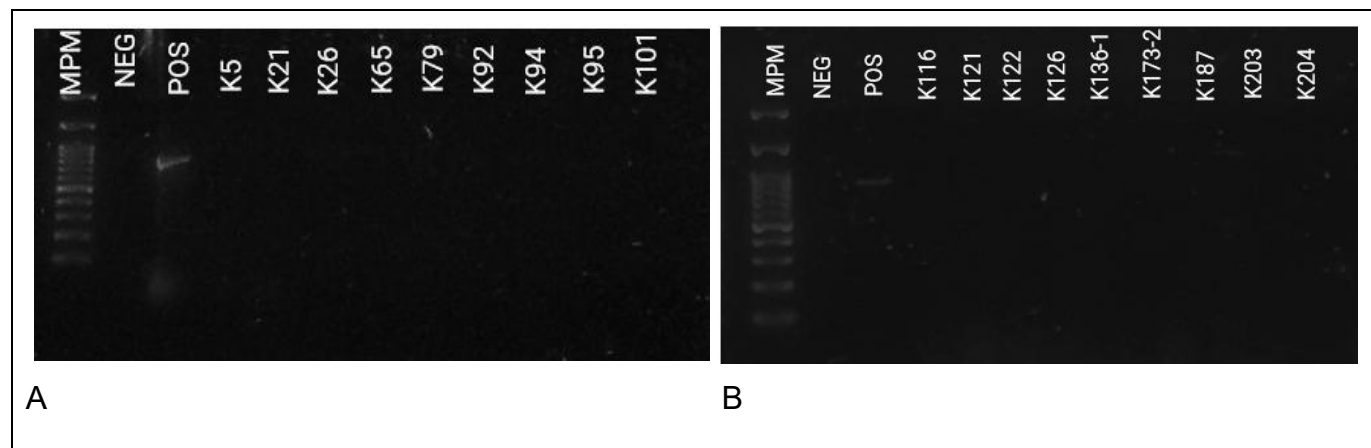


Figura 10 Amplificación gen bla_{GES}.

Se presentaron coproducciones entre KPC y NDM, las cuales representaron el 15.4%. En la tabla 8 se muestra la frecuencia de coproducciones entre KPC y NDM.

Tabla 8. Aislamientos positivos para coproducciones (KPC/NDM)

Bacteria	KPC	NDM	KPC/NDM
<i>Citrobacter farmeri</i>	0	1	0
<i>Citrobacter koseri</i>	1	0	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0
<i>Enterobacter cloacae complex</i>	3	0	0
<i>Escherichia coli</i>	2	3	1
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0	1	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	2	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	7	4
<i>Proteus mirabilis</i>	0	1	0
<i>Providencia rustigianii</i>	0	1	0
<i>Serratia maracenses</i>	0	0	0
Total general	25	16	6

Se realizó la determinación del tipo de carbapenemasa por inmunocromatografía y se confirmó el resultado por PCR de punto final. En la tabla 9 se presenta un análisis detallado de los resultados obtenidos por cromatografía y PCR en la identificación de genes de resistencia en distintas especies de Enterobacterales.

Tabla 9. Resultados cromatografía y PCR de aislamientos de estudio

N° ID	Bacteria	CROMATOGRAFIA				PCR		
		KPC	NDM	OXA-48	VIM	KPC	NDM	GES
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X	X			X	X	
5	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	X				X		
18	<i>Escherichia coli</i>			X				
21	<i>Klebsiella oxytoca</i>	X	X			X	X	
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X	X			X	X	
30	<i>Escherichia coli</i>		X				X	
31	<i>Citrobacter freundii</i>	X			X	X		
65	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X				X		
79	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	X				X		
85	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		X				X	
92	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X				X		
95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X	X			X	X	
94	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X				X		
101	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	X				X		
108	<i>Enterobacter aerogenes</i>	X				X		
111	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X				X		

116	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X				X		
121	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X	X			X	X	
122	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X				X		
126	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X				X		
127	<i>Providencia rustigianii</i>		X				X	
130	<i>Klebsiella oxytoca</i>		X				X	
136-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X				X		
136-2	<i>Escherichia coli</i>	X	X			X	X	
159	<i>Proteus mirabilis</i>		X				X	
171	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X				X		
173-1	<i>Klebsiella aerogenes</i>		X				X	
173-2	<i>Escherichia coli</i>	X				X		
175	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NEGATIVO				NEGATIVO		
182	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X				X		
187	<i>Citrobacter koseri</i>	X				X		
189-1	<i>Escherichia coli</i>		X				X	
189-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X				X		
192	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		X				X	
203	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X				X		
204-2	<i>Enterobacter cloacae</i>	X				X		
211	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		X				X	
219	<i>Citrobacter farmeri</i>		X				X	

En análisis estadístico, la prueba de Kappa de cohen mostró que existe una muy buena concordancia al arrojar un valor de 1.0 entre los dos métodos de identificación del tipo de carbapenemasa.

Tabla 10 Resultado prueba de Kappa de Cohen

Medidas simétricas					
		Valor	Error estándar asintótico ^a	T aproximada ^b	Significación aproximada
Medida de acuerdo	Kappa	1,000	0,000	9,642	0,000
N de casos válidos		40			
a. No se presupone la hipótesis nula.					
b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.					

6.3 Secuenciación de Sanger

Las variantes de genes *bla_{KPC}* identificados con mayor prevalencia fueron *bla_{KPC-2}* (54.2%), *bla_{KPC-3}* (12.5%), y *bla_{KPC-19}* (33.3%). La mayoría de las identidades están por encima del 99%, lo cual confirma una alta similitud con las referencias de secuencia NCBI. En la tabla 10 se muestran los resultados del análisis bioinformático realizado en las bases de datos ResFinder y NCBI para las variantes de KPC.

Tabla 11. Resultados variantes KPC aislamientos de estudio

N° Aislamiento	Bacteria	NCBI Reference Sequence:	Porcentaje	Resistance gene	Identity
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC-19}</i>	99.27%
5	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	WP_004199234.1 WP_088912091.1	98.05% 100%	<i>bla_{KPC-2}</i>	99.64%
21	<i>Klebsiella oxytoca</i>	WP_004199234.1 WP_088912091.1	98.05% 100%	<i>bla_{KPC-19}</i>	99.52%
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC-2}</i>	99.39%
65	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC-2}</i>	99.88%
79	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC-2}</i>	99.88%
92	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC-19}</i>	99.76%
94	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1 WP_088912091.1	96.24% 96.14%	<i>bla_{KPC-2}</i>	99.15%
95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC-19}</i>	99.76%
101	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC-2}</i>	99.75%
108	<i>Enterobacter aerogenes</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC-19}</i>	99.76%
111	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC-2}</i>	99.88%
116	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC-3}</i>	100.00%
121	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC-2}</i>	100.00%
122	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC-19}</i>	99.76%
126	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1 WP_088912091.1	99.24% 99.61%	<i>bla_{KPC-3}</i>	99.76%

136-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC}-2</i>	100.00%
136-2	<i>Escherichia coli</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC}-19</i>	99.88%
171	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC}-3</i>	99.34%
173-2	<i>Escherichia coli</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC}-2</i>	100.00%
182	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC}-2</i>	100.00%
187	<i>Citrobacter koseri</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC}-2</i>	100.00%
189-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1	100%	<i>bla_{KPC}-2</i>	98.03%
203	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004199234.1 WP_088912091.1	97.67% 100%	<i>bla_{KPC}-2</i>	98.91%
204-2	<i>Enterobacter cloacae</i>	WP_004199234.1 WP_088912091.1	99.59% 99.59%	<i>bla_{KPC}-19</i>	98.01%

La variante de gen NDM detectada en todos los aislados fue NDM-1. La mayoría con identidades por encima del 98%, lo cual confirma una alta similitud con las referencias de las secuencias NCBI. En la tabla 11 se muestran los resultados del análisis bioinformático realizado en las bases de datos ResFinder y NCBI para las variantes de NDM.

Tabla 11. Resultados variantes NDM aislamientos de estudio

N°	Bacteria	NCBI Reference Sequence:	Porcentaje	Resistance gene	Identity
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_032729445.1	92.3%	<i>bla_{NDM}-1</i>	99.45%
21	<i>Klebsiella oxytoca</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1	96.93% 96.93%	<i>bla_{NDM}-1</i>	100.00%
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	100% 100% 90.00%	<i>bla_{NDM}-1</i>	99.63%
30	<i>Escherichia coli</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	100% 100% 92.21%	<i>bla_{NDM}-1</i>	100.00%
85	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	100% 100% 92.16%	<i>bla_{NDM}-1</i>	99.63%
95	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	100% 100% 92.21%	<i>bla_{NDM}-1</i>	99.63%
121	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	100% 100% 91.95%	<i>bla_{NDM}-1</i>	97.96%

127	<i>Providencia rustigianii</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	100% 100% 91.82%	<i>bla_{NDM-1}</i>	99.82%
130	<i>Klebsiella oxytoca</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	97.98% 97.98% 90.12%	<i>bla_{NDM-1}</i>	99.64%
136-2	<i>Escherichia coli</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	97.98% 97.98% 91.82%	<i>bla_{NDM-1}</i>	99.82%
159	<i>Proteus mirabilis</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	100% 100% 92.00%	<i>bla_{NDM-1}</i>	99.61%
173-1	<i>Klebsiella aerogenes</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	100% 100% 91.46%	<i>bla_{NDM-1}</i>	100.00%
189-1	<i>Escherichia coli</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	100% 100% 90.42%	<i>bla_{NDM-1}</i>	100.00%
192	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	100% 100% 90.42%	<i>bla_{NDM-1}</i>	100.00%
211	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	100% 100% 90.48%	<i>bla_{NDM-1}</i>	100.00%
219	<i>Citrobacter farmeri</i>	WP_206450020.1 WP_004201164.1 WP_069953510.1	100% 100% 92.77%	<i>bla_{NDM-1}</i>	100.00%

6.4 Secuenciación multilocus (MLST)

Klebsiella pneumoniae:

Para el análisis de MLST (Multi-Locus Sequence Typing) se incluyeron 17 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*. Se secuenciaron 7 genes conservados: *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* y *tonB*, y se asignó el perfil alélico para cada cepa y así conocer la secuencia tipo (ST) de cada aislamiento. Se identificaron 14 tipos de ST diferentes entre los 17 aislamientos. Las STs más frecuentes fueron **ST258** (KP111/ KP122) y **ST11** (KP116/KP171). En la tabla 12, se resumen los resultados.

Tabla 12 MLST para *Klebsiella pneumoniae*

Muestra ID	ST	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>RpoB</i>	<i>tonB</i>
KP2	622	17	19	39	20	34	18	52
KP26	365	16	28	36	62	76	22	104
KP85	219	2	1	401	3	27	1	39
KP92	17	2	1	1	1	4	4	4

KP94	414	18	22	26	63	85	20	51
KP95	37	2	9	2	1	13	1	16
KP111	258	3	3	1	1	1	1	79
KP116	11	3	3	1	1	1	1	4
KP121	622	17	19	39	20	34	18	52
KP122	258	3	3	1	1	1	1	79
KP136	29	2	3	2	2	6	4	4
KP171	11	3	3	1	1	1	1	4
KP175	147	3	4	6	1	7	4	38
KP182	18	2	1	1	1	4	1	4
KP189	4609	16	28	21	49	47	1	67
KP192	307	4	1	2	52	1	1	7
KP203	2218	98	80	175	20	258	1	162

Los resultados de la Tabla 13 muestran la presencia de carbapenemasas en aislamientos de *K. pneumoniae* asociados a la secuencia tipo detectada por MLST

Tabla 13. ST asociado a carbapenemasas en aislamiento K.pneumoniae

Muestra	ST	Carbapenemasa
KP2	622	KPC/NDM
KP26	365	KPC/NDM
KP85	219	NDM
KP92	17	KPC
KP94	414	KPC
KP95	37	KPC/NDM
KP111	258	KPC
KP116	11	KPC
KP121	622	KPC/NDM
KP122	258	KPC
KP136	29	KPC
KP171	11	KPC
KP175	147	Negativo
KP182	18	KPC
KP189	4609	KPC
KP192	307	NDM
KP203	2218	KPC

Escherichia coli

El análisis MLST de *Escherichia coli* se realizó con cinco aislamientos de mediante el análisis de 7 genes específicos: *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*. Los resultados revelaron la presencia de clones clínicamente relevantes y emergentes como ST12, ST457 y ST1598, los cuales tienen implicaciones epidemiológicas importantes en la diseminación de resistencia a carbapenémicos. La tabla 14 muestra los alelos asociados a cada gen y el tipo de secuencia asignado según la base de datos del instituto pasteur <https://bigsd.b.pasteur.fr/ecoli/>. La tabla 15 presenta los aislamientos relacionados con cada secuencia y carbapenemasa detectada.

Tabla 14. Resultado MLST Escherichia coli

Muestra ID	ST	<i>Adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>
EC18	1598	8	7	1	8	8	13	47
EC30	12	13	13	9	13	16	10	9
EC136	457	101	88	97	108	26	79	2
EC173	457	101	88	97	108	26	79	2
EC189	10	10	11	4	8	8	8	2

En el contexto del estudio de las carbapenemasas, la tabla 15 proporciona una visión detallada de los STs (tipos de secuencia) asociados a carbapenemasas en aislamientos de *E. coli*. Estos datos son esenciales para entender la distribución y prevalencia de estas enzimas, que son cruciales en la resistencia a los carbapenémicos.

Tabla 15. ST asociado a carbapenemasas en aislamiento E.coli

Muestra	ST	Carbapenemasa
EC18	1598	OXA-48
EC30	12	NDM
EC136	457	KPC/NDM
EC173	457	KPC
EC189	10	NDM

7. DISCUSIÓN

En este estudio se caracterizaron los genes *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* y *bla_{GES}* en 40 aislamientos clínicos de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas. Del total de cepas analizadas, el 50% correspondió a *Klebsiella pneumoniae*, seguida por *Escherichia coli* y el complejo *Enterobacter cloacae*, con una representación del 12,5% cada uno. Estos hallazgos evidencian la predominancia de *K. pneumoniae* como el principal patógeno productor de carbapenemasas en la población evaluada, lo cual es consistente con lo reportado en diversos estudios internacionales, en los que esta especie se destaca como uno de los principales reservorios y diseminadores de genes de resistencia a carbapenémicos (7,22,63,64). Esta bacteria es ampliamente reconocida por su alta capacidad para adquirir mecanismos de resistencia a múltiples clases de antibióticos, incluyendo los β -lactámicos de última línea, como los carbapenémicos, lo que la posiciona como un patógeno crítico en los programas de vigilancia epidemiológica global (65).

Ramos et al. (2018), en una revisión sistemática de infecciones causadas por *K. pneumoniae* productora de KPC entre 1997 y 2017, reportaron que el tipo de infección más frecuente fue la bacteriemia (28%), con una tasa de mortalidad asociada cercana al 41% (38). De manera similar, la evidencia sugiere un aumento sostenido en la incidencia de infecciones por este patógeno, como lo señala el informe de la Organización Mundial de la Salud de 2024 (66). Este documento, basado en datos de la Red Latinoamericana y del Caribe de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA+), advierte sobre el incremento en los reportes EPC y el crecimiento sostenido de aislamientos de *K. pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos en la región de las Américas. Adicionalmente, el informe destaca la creciente identificación de cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* (hvKp), en particular del linaje clonal ST23 portador de genes de carbapenemasa. Estas cepas emergentes se distinguen por su capacidad de causar infecciones invasivas tanto en personas inmunocomprometidas como en individuos sanos. La hipervirulencia de *K. pneumoniae* se asocia con la hiperproducción de cápsula, un fenotipo conocido como hiper mucoviscosidad, observable como colonias de aspecto

mucilaginoso (67). Este nuevo patotipo representa una amenaza significativa para la salud pública, ya que combina mecanismos de resistencia y virulencia aumentada.

En otros contextos geográficos, como Grecia, también se ha documentado una propagación significativa de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas. Entre 2005 y 2009, se reportaron múltiples brotes hospitalarios asociados a cepas productoras de VIM y KPC-2, en consonancia con datos del Sistema Europeo de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (EARSS) (67,68). En 2007, las tasas de resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* alcanzaron el 46% en ese país. Posteriormente, entre 2018 y 2022, se identificó una amplia expansión de linajes clonales como ST15, ST323, ST39 y ST11, asociados con la producción de diversas carbapenemasas (KPC, VIM, NDM y OXA-48) en hospitales griegos (67,68). Estos hallazgos subrayan el potencial de diseminación global de *K. pneumoniae* multirresistente y la urgencia de su vigilancia genómica y epidemiológica.

En conjunto, *Escherichia coli* y el complejo *Enterobacter cloacae* representaron el 25% de los aislamientos analizados, lo que evidencia su relevancia como agentes etiológicos asociados a infecciones por *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos (24,64,69,70). Ambas especies son miembros clave de este grupo bacteriano y están ampliamente documentadas como causantes de infecciones intrahospitalarias, con una creciente capacidad para adquirir mecanismos de resistencia a antibióticos de última línea, incluidos los carbapenémicos (62,64,69).

Enterobacter spp. es el segundo género de la familia *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenémicos más común en los Estados Unidos (71). La resistencia a antibióticos de amplio espectro, incluyendo la resistencia a carbapenémicos ha generado un mayor interés en este grupo. El complejo *E. cloacae* (ECC) fue uno de los primeros organismos productores de KPC identificados (71,72), y recientemente se ha demostrado un aumento en su prevalencia y distribución. (72,73). El ECC incluye patógenos intrahospitalarios comunes capaces de producir una amplia variedad de infecciones como neumonía, infecciones del tracto urinario y septicemia (71). La literatura actual indica que la aparición y propagación de *Enterobacter* resistente a carbapenémicos se

debe a la alta diversidad de linajes clonales (71). El estudio de Peirano et al, del 2018 demostró la notable diseminación y variedad de genes de carbapenemasas en el complejo *Enterobacter cloacae* siendo VIM y NDM las carbapenemasas más comunes en este grupo (74).

Enterobacter hormaechei es el patógeno intrahospitalario del complejo más frecuentemente identificado en aislados clínicos humanos (71,73). Diversos estudios han demostrado que *E. hormaechei* puede ser aislado de muestras de sangre, esputo, orina, bilis, heces y piel, indicando su papel en enfermedades infecciosas tales como bacteriemia, neumonía, infecciones del tracto urinario, infecciones del tracto biliar, colitis y celulitis (71–73). *E. hormaechei* puede presentar una mayor virulencia en comparación con otras especies del ECC debido a la presencia frecuente de una isla de alta patogenicidad en su cromosoma (10,73) asociados al plásmido IncF (pM1) (75).

Escherichia coli es uno de los patógenos más relevantes en humanos, especialmente como causante de infecciones adquiridas en la comunidad, como infecciones del tracto urinario, sepsis y gastroenteritis (76). Además de su papel como patógeno oportunista, *E. coli* actúa como un reservorio clave de genes de resistencia a los antibióticos (ARG), lo que facilita su diseminación horizontal hacia otras bacterias gramnegativas. La persistente aparición de cepas de *E. coli* resistentes a carbapenémicos (CREC) representa una amenaza creciente para la salud pública, ya que compromete la eficacia de antibióticos de último recurso y reduce significativamente las opciones terapéuticas disponibles en el ámbito clínico (77).

Yan et al., realizaron un análisis exhaustivo de la distribución global de aislados de CREC en la base de datos del NCBI de 2006 a 2023 reportando que los genes de carbapenemasas más comunes entre estos aislados de CREC fueron *bla*_{NDM} (52,15%), distribuidos predominantemente en países asiáticos como en China (22,84%) y en India, siendo la ST principal ST167. Por su parte, el estudio de Xiaoliang et al. destaca que *E. coli* ST410 ha emergido recientemente como un linaje extraintestinal multirresistente (MDR) exitoso, responsable de un número creciente de infecciones a nivel global (76).

En el estudio de Yan et al., la variante *bla*_{NDM-5} fue la más comúnmente detectada, superando a *bla*_{NDM-1} en frecuencia, y mostrando un aumento sostenido en los registros del NCBI. La diseminación de *bla*_{NDM} estuvo fuertemente asociada con elementos genéticos móviles como el gen de resistencia *aph*(3')-VI y las secuencias de inserción IncC e IncN2, que facilitan su propagación horizontal.(77). En este mismo estudio se evidenció que los aislamientos de CREC *bla*_{KPC} se notificaron en mayor proporción en el Reino Unido (31,55%), siendo *E. coli* ST131 el linaje predominante (77). Esta secuencia tipo está ampliamente distribuida a nivel mundial y se asocia fuertemente con infecciones de origen comunitario debido a la presencia de múltiples factores de virulencia, lo que incrementa el riesgo de fracaso terapéutico (77). Además, secuencias de inserción como ISKpn7, ISKpn27, ISAs12, ISKpn14, y plásmidos como IncN e IncFII(pKP91) mostraron una fuerte asociación con la presencia de *bla*_{KPC-2} (77).

La detección y vigilancia de la colonización intestinal con *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos (ERC) por hisopado rectal desempeña un papel importante en ambientes hospitalarios (78,79). La integración de este tamizaje con intervenciones como el aislamiento de pacientes, la agrupación de cohortes, la limpieza ambiental y la capacitación del personal podría disminuir significativamente las tasas de infección e infección cruzada.(80). Los pacientes en UCI han sido el objetivo de la vigilancia rectal por ERC en países de altos ingresos por múltiples razones, incluido el uso extensivo de antibióticos y el estado de salud crítico de los pacientes, que haría que las infecciones resistentes a los medicamentos sean aún más difíciles de tratar (79–81).

Diversos estudios han demostrado que una proporción significativa de pacientes con colonización pueden progresar a una infección invasiva en cuestión de días (81). El uso generalizado y no regulado de antibióticos en países de bajos y medianos ingresos, junto con el aumento de procedimientos médicos ambulatorios y otros procedimientos relacionados con la atención médica, ha llevado a una mayor colonización por ERC en pacientes sin factores de riesgo tradicionales y a más infecciones adquiridas en la comunidad (78,81).

En ese contexto, el estudio de Adekanmbi et al, reveló que uno de cada diez pacientes atendidos en el primer nivel de atención en salud estaba colonizado por ERC (11,1%), lo cual sugiere una adquisición comunitaria del microorganismo. El principal factor predisponente identificado fue el uso previo de antibióticos, más que la hospitalización o la exposición directa a servicios médicos intrahospitalario (81). Asimismo, se observó que dos de los 51 aislamientos de ERC (3,9%) eran panresistentes, es decir, resistentes a todos los antibióticos disponibles localmente, y el 84,3% presentaba multirresistencia, incluyendo resistencia a colistina y tigeciclina, lo que subraya la gravedad del problema en contextos con recursos terapéuticos limitados (81).

Perfil de resistencia antibiótica

En nuestro estudio los perfiles de susceptibilidad a diversos antibióticos, incluyendo Meropenem, Imipenem, Ertapenem, Ceftazidima/Avibactam, Ceftriaxona y Cefepime, fueron determinados utilizando el sistema automatizado BD Phoenix™ M50. La resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* refuerza su rol como principal reservorio de genes de carbapenemasa en entornos hospitalarios (74).

Los aislamientos ERC del estudio demostraron una significativa resistencia a las fluoroquinolonas, en particular a la ciprofloxacina, así como a los inhibidores de la beta-lactamasa, representados por piperacilina-tazobactam. Esto evidencia el arsenal genético de estas bacterias que les confiere resistencia a otros grupos de antibióticos.(82)

En el estudio se observa que todos los aislamientos (100%) fueron sensibles a la amikacina, lo cual puede sugerir que este antibiótico podría ser una opción terapéutica contra las ERC, sin embargo, el uso de amikacina en el tratamiento de ERC está limitado por su potencial nefrotoxicidad, lo que implica riesgos para los pacientes, especialmente aquellos en estado crítico o con comorbilidades renales. Las principales preocupaciones sobre el uso de amikacina incluyen la dificultad para alcanzar los objetivos farmacocinéticos (PK)/farmacodinámicos (PD) con las dosis habituales, la nefrotoxicidad y el desarrollo de resistencia durante el tratamiento y el aumento de la dosis puede resultar problemático. Además, la terapia combinada con fármacos como las polimixinas

puede incrementar su potencial nefrotóxico (83). Por lo tanto, su administración debe ser cuidadosamente monitoreada y considerada dentro de un contexto clínico adecuado.

Otras opciones terapéuticas, como las polimixinas, la fosfomicina y la tigeciclina, no fueron probadas por el sistema automatizado BD Phoenix™ M50. La polimixina B y la colistina son antibióticos de última línea utilizados en el tratamiento de infecciones por bacterias resistentes a múltiples fármacos, incluyendo las carbapenemasas (84,85). La fosfomicina, aunque efectiva contra ciertas cepas resistentes, requiere una cuidadosa administración para evitar la rápida aparición de resistencias (86). La tigeciclina también ha mostrado eficacia en el tratamiento de infecciones complicadas, pero su uso está limitado por preocupaciones sobre su seguridad y efectividad en altas concentraciones tisulares (87–89). Estos agentes, aunque prometedores, deben ser evaluados dentro de un contexto clínico adecuado y bajo estricta supervisión médica para maximizar su eficacia y minimizar los efectos adversos (84,86,87).

En el estudio se observó un porcentaje del 30% de resistencia para CAZ/AVI y un porcentaje de >50% de sensibilidad. Esto sugiere que este antibiótico combinado puede ser efectivo contra ciertos aislados productores de carbapenemasas. CAZ/AVI aprobado en 2015 en EE. UU. y en 2016 en Europa, muestra excelente actividad *in vitro* contra *Enterobacterales* productores de KPC, y está asociado con una menor tasa de mortalidad en pacientes tratados (40). En este estudio, se observó un 30% de resistencia debido a coproducciones entre KPC y NDM, lo cual está asociado con metalcarbapenemasas. Las bacterias productoras de MBL son naturalmente resistentes a CAZ/AVI porque sus MBL no contienen una serina en su sitio activo (90). No obstante, también se observa un incremento en la MIC de algunos aislados, lo cual puede atribuirse a la presencia de nuevas variantes de carbapenemasas con resistencia a CAZ/AVI, incrementando así la tasa de falla terapéutica. (91,92)

Avibactam, patentado en 2011, es un inhibidor no β -lactámico de β -lactamasa activo contra las β -lactamasas clase A y C de Ambler, y algún tipo OXA de la clase D (93). Su mecanismo de acción implica la unión covalente a la β -lactamasa mediante la formación de un enlace tipo carbamato entre el carbono carbonílico en la posición 7 del avibactam

y la serina del sitio activo de la enzima, la cual participa normalmente en la formación del enlace acilo con los sustratos de las β -lactamasas (90,92). Este compuesto ha demostrado actividad frente a aislamientos hipervirulentos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos (CRKP); no obstante, se ha documentado la aparición de resistencia a la combinación CAZ/AVI en cepas productoras de KPC. (92). Algunos estudios han reportado la incapacidad del avibactam para inhibir variantes específicas de KPC-2, y la aparición temprana de resistencia asociada a KPC-3 (92). En variantes de KPC resistentes a CAZ/AVI se han identificado diversas alteraciones genéticas, como mutaciones puntuales, inserciones y deleciones en sitios críticos de la enzima. Hasta julio de 2022, se habían reportado al menos 65 variantes de KPC resistentes a esta combinación, las cuales presentan diferencias tanto en su perfil mutacional como en los fenotipos de resistencia frente a otros β -lactámicos, incluyendo carbapenémicos (37,40,94).

Detección fenotípica y molecular de carbapenemasas

La detección de los genes *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}* mediante PCR reveló que el 66.7% (25) de los aislamientos fueron positivos para *bla_{KPC}*, mientras que el 43.6% (16) fueron positivos para *bla_{NDM}*. Estos resultados indican una alta prevalencia de los genes *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}* en los aislamientos clínicos, lo que subraya la importancia de estos genes en la resistencia a los carbapenémicos en la región estudiada. *K. pneumoniae* fue la especie más frecuente con positividad a NDM, presente en 10 de los 17 casos, seguida de *E. coli* con 4 casos.

Se registró una coproducción de KPC y NDM en el 15.4% de las cepas analizadas, donde el 67% correspondió a aislamientos de *K. pneumoniae*. La presencia simultánea de estas enzimas supone un desafío significativo para el tratamiento de las infecciones, dado el incremento de resistencia contra múltiples antibióticos y la ineficacia de CAZ/AVI frente a NDM. La presencia de *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}* en los mismos aislamientos indica una capacidad alta de transferencia horizontal de genes de resistencia, facilitada por elementos genéticos móviles como plásmidos y transposones. (35,39). Aunque KPC y NDM pertenecen a diferentes clases de carbapenemasas, ambas presentan un amplio espectro hidrolítico de β -lactámicos, incluyendo penicilinas, cefalosporinas y

carbapenémicos (34). Estas bacterias presentan resistencia a casi todas las combinaciones de β -lactámicos/inhibidores de β -lactamasa y carbapenémicos comúnmente empleados. Si bien opciones terapéuticas alternativas como los aminoglucósidos, la colistina y la tigeciclina pueden ofrecer eficacia, no se pueden ignorar los riesgos potenciales de nefrotoxicidad y aumento de la mortalidad asociados con estos agentes (35).

Desde 2020, se han reportado con mayor frecuencia casos de pacientes con infecciones por KPC-NDM-CRKP en todo el mundo. El clon ST11 se encontró predominantemente en cepas KPC-NDM-CRKP. También se identificaron otras ST, como ST15, ST22, ST23, ST39, ST86, ST147, ST258, ST464 y ST512 (39,95). Aunque la vía evolutiva para formar KPC-NDM-CRKP sigue siendo en gran parte desconocida, Huang et al. han demostrado que el proceso de evolución de KPC-NDM-CRKP sigue dos vías distintas. En primer lugar, KPC-NDM-CRKP podría originarse a partir de *K. pneumoniae* productora de KPC y adquirir el plásmido que codifica NDM más tarde. Otra vía evolutiva de KPC-NDM-CRKP implica la adquisición del plásmido que codifica el gen *bla_{KPC}* por *K. pneumoniae* productora de NDM; sin embargo, esta segunda vía evolutiva es considerada menos probable (39).

Todos los aislamientos con metalobetalactamasas del estudio fueron positivos para NDM-1. NDM es una betalactamasa de considerable relevancia clínica debido a su capacidad de inactivar una amplia gama de antibióticos betalactámicos, con la excepción del aztreonam, gracias a la flexibilidad de su sitio activo (12,14). Además, la resistencia bacteriana se intensifica por la presencia de factores adicionales de virulencia, tales como bombas de eflujo hiperactivas, reducción de la permeabilidad de la membrana, transpeptidasas, esterases y sintasas mutadas.

La movilidad genética facilitada por transposones y elementos IS, inicialmente mediante Tn₁₂₅ e IS_{Aba125}, ha permitido que el gen *bla_{NDM}* se propague a diversas estructuras plasmídicas (96). Los aislamientos portadores del gen NDM-1 pueden tornarse ineficaces a múltiples antibióticos, incluyendo carbapenémicos y otros betalactámicos (12–14).

En el estudio no se encontraron aislamientos positivos para *bla*_{GES}. Las β -lactamasas de tipo GES son un mecanismo de resistencia emergente y su incidencia aún es baja, especialmente en *Enterobacterales* (97,98). En España, datos de estudios multicéntricos muestran que las β -lactamasas de tipo GES son muy raras en *Enterobacterales*, como se demostró en el estudio CARB-ES-19, sin embargo, en España, los aislados de *P. aeruginosa* portadores de GES parecen estar aumentando (97,99).

GES se informa con frecuencia en *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli* y *K. pneumoniae* (98). Las enzimas GES tienen la capacidad de extender su espectro hidrolítico a los carbapenémicos mediante mutaciones puntuales. Por ejemplo, la mutación en la posición 170 (de Gly170 a Asn/Ser170) es crítica para su capacidad de hidrolizar β -lactámicos de último recurso. Esta mutación se asocia con una mayor actividad hidrolítica contra el imipenem (98,99). Los genes *bla*_{GES} se han descrito como casetes de genes asociados a integrones en plásmidos, lo que facilita su diseminación horizontal. GES-5 muestra mayores actividades de hidrólisis de carbapenémicos y las infecciones intrahospitalarias causadas por cepas productoras de GES-5 a menudo responden solo a amikacina y colistina, lo cual es motivo de preocupación (97–99).

La concordancia entre ambas metodologías utilizadas en el estudio para la identificación de las carbapenemasas fue del 100%, lo cual valida la robustez de estas técnicas. Obtener un resultado rápido, el mismo día, es útil para el control temprano de infecciones y reducir su propagación. La prueba inmunocromatográfica, visible en 15 minutos, es fácil de realizar y no requiere maquinaria ni habilidades especiales (95).

En este estudio se obtuvo un aislamiento (N°175) negativo para la identificación de las carbapenemasas por ambos métodos. La falta de detección podría deberse a la presencia de una carbapenemasa diferente a las evaluadas en el estudio o a la presencia de mutaciones que impida su detección por los métodos empleados en este trabajo.

La secuencia tipo correspondiente al aislamiento 175 es ST147, un clon de alto riesgo de *K. pneumoniae* asociado a características de hipervirulencia y multirresistencia (100). La ST147 se encuentra asociada a plásmidos de resistencia significativos como IncFIB(K), IncFII(K) e IncR, junto con loci de virulencia como fimH, mrkD e iutA (101).

Los genes *iuc*, *rmpA* y *rmpA2* son marcadores predictivos de *K. pneumoniae* hipervirulenta (102). Los plásmidos de hipervirulencia contribuyen a la patogenicidad de las cepas hvKP de varias maneras, los reguladores mucoides *rmpA* y *rmpA2* aumentan la producción de cápsulas y la hipermucoviscosidad, y se cree que los sideróforos proporcionan acceso a las reservas de hierro secuestradas por el huésped (103).

La emergencia del patotipo hipervirulento (*hvKp*) representa una amenaza creciente, ya que estas cepas poseen una mayor capacidad invasiva en comparación con las variantes clásicas (*cKp*). Mientras que *cKp* se caracteriza por la adquisición frecuente de elementos genéticos móviles que confieren multirresistencia, *hvKp* es reconocida por causar infecciones graves en pacientes previamente sanos. No obstante, se ha documentado una preocupante convergencia entre ambos patotipos: cepas multirresistentes que adquieren plásmidos de virulencia, o cepas hipervirulentas que incorporan plásmidos de resistencia a antibióticos, incluidas las carbapenemasas (36,68,104). Esta convergencia ha dado lugar a cepas de *K. pneumoniae* hipervirulentas y multirresistentes (*hvKp*-MDR), caracterizadas por la presencia del locus *iuc* y la producción de BLEE o carbapenemasas (67,104). Aunque históricamente *hvKp* ha sido sensible a la mayoría de los antimicrobianos, salvo a la ampicilina, el aumento de cepas convergentes en los últimos años subraya un cambio preocupante en el panorama clínico de esta especie (36).

La secuenciación mediante el método de Sanger, junto con el análisis bioinformático, permitió identificar diversas variantes del gen *bla_{KPC}*, entre ellas *bla_{KPC-2}*, *bla_{KPC-3}* y *bla_{KPC-19}*. Estas variantes son reconocidas por su capacidad para hidrolizar una amplia gama de antibióticos β-lactámicos, lo que contribuye significativamente al perfil de multirresistencia observado en los aislamientos clínicos (37,95,105).

KPC-2 es la variante más común y se considera la forma ancestral de la familia de carbapenemasas KPC. Esta variante corresponde a la secuencia de referencia del gen *bla_{KPC}*, sin presentar mutaciones adicionales, y se caracteriza por una alta eficiencia hidrolítica frente a los carbapenémicos. El primer reporte de KPC-2 en *K. pneumoniae* fue realizado por Yigit et al. en 2001(106).

KPC-3 presenta como mutación principal la sustitución de Histidina (H) por Arginina (R) en la posición 272 (H272R), aumentando la estabilidad térmica de la enzima y, al mismo tiempo le brinda una hidrólisis más eficiente frente a ciertos carbapenémicos como meropenem. Esta variante puede aumentar la resistencia a inhibidores de β -lactamasas, como avibactam (107).

KPC-19 presenta como mutación principal una sustitución de Asparagina por Treonina en la posición 291 (N291T), en comparación con la enzima KPC-3; esta mutación reduce ligeramente la actividad catalítica frente a carbapenémicos, pero genera diferencias en la susceptibilidad a inhibidores (61,108,109). Además, podría conferir adaptaciones evolutivas en entornos con presión antibiótica prolongada (110). En particular, los aislados de *K. pneumoniae* pertenecientes al grupo clonal CG258 (ST258, ST11, sus variantes de locus único y otros tipos de secuencias estrechamente relacionados) son los más ampliamente distribuidos en el mundo. El ST258 fue reconocido como un clon exitoso, desempeñando un papel importante en la aparición y diseminación de *bla*_{KPC19}, y el ST11 también está significativamente asociado con la diseminación de este mecanismo de resistencia, siendo considerado de manera similar un clon exitoso (109).

KPC-19 se detectó por primera vez a principios de 2013, en un paciente de 52 años con cirrosis hepática descompensada post alcohólica asociado al ST1519 (109,111). Desde entonces, ha habido pocos reportes sobre KPC-19, lo que resalta la importancia de realizar seguimiento epidemiológico.

Los complejos clonales CG258, CG15 y ST307 albergan una amplia variedad de genes de resistencia a antimicrobianos y se encuentran diseminados globalmente. Estos clones están estrechamente asociados con infecciones relacionadas con la atención en salud y brotes intrahospitalarios (112)(113). En particular, el complejo clonal CC258 ha sido identificado como el principal grupo de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos a nivel mundial, con una alta prevalencia y capacidad de diseminación. Este complejo incluye 43 secuencias tipo, entre las que destacan ST11, ST258, ST340, ST437 y ST512, consideradas las más frecuentes (36). Informes recientes estiman que aproximadamente el 7,5 % de las secuencias tipo asociadas a cepas productoras de carbapenemasas

pertenecen al CC258 y han sido identificadas en diversas regiones del mundo. ST11 es la secuencia tipo predominante en Asia y América Latina, mientras que ST258 lidera en América del Norte, América Latina y algunos países europeos. Por su parte, ST340 ha sido reportada en Grecia y Brasil, y ST512 en Israel, Italia y Colombia (36)(69).

Por otro lado, ST1598 es un tipo de secuencia poco frecuente, identificado principalmente en aislamientos clínicos asociados con infecciones del tracto urinario y sepsis. En contraste, ST12 es un clon bien establecido a nivel global, conocido por su implicación en infecciones extraintestinales, particularmente infecciones del tracto urinario (114). Este clon ha sido vinculado con resistencia a β -lactámicos, incluida la producción de carbapenemasas como NDM y OXA-48 (115,116). Asimismo, ST457 ha surgido como un clon emergente asociado a infecciones tanto en humanos como en animales. Su detección frecuente en aislamientos resistentes a carbapenémicos y otros antibióticos sugiere una intensa presión selectiva sobre este linaje (117,118). Por su parte, ST10 representa un linaje basal ancestral de *E. coli*, presente en cepas tanto comensales como patógenas. Este linaje se ha identificado en una amplia variedad de infecciones clínicas, mostrando una notable diversidad genética y un papel importante en la epidemiología de brotes y en la diseminación de resistencia a antibióticos de amplio espectro (119–121).

8. CONCLUSIONES

- Este estudio presenta un análisis de la frecuencia de genes de resistencia a los carbapenémicos, particularmente *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}*, en aislamientos clínicos de *Enterobacterales* en un hospital regional de Cali.
- Se evidenció una coproducción del 15.4% de KPC y NDM. Las variantes detectadas para KPC fueron KPC-2, KPC-3 y KPC-19. Todos los aislamientos positivos para NDM presentaron la variante NDM-1.
- El microorganismo mayormente aislado fue *Klebsiella pneumoniae*, seguido de *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae complex*. Asimismo, se detectaron dos ST de alto riesgo: ST258 y ST147 para los aislamientos de *K. pneumoniae*.
- Los resultados muestran la necesidad de implementar controles efectivos y vigilancia continua para frenar los genes de resistencia. Actualizar datos epidemiológicos es crucial para estrategias de control adaptadas a las cepas de CPE. La información obtenida mejora los desenlaces clínicos en pacientes con infecciones por Enterobacterales productores de carbapenemasas y subraya la importancia de seguir investigando en este campo.

9. PERSPECTIVAS

- Es crucial realizar estudios longitudinales que investiguen cómo las mutaciones en genes como *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}* afectan la resistencia antimicrobiana y la eficacia de los tratamientos. Evaluar el impacto de mutaciones específicas en la estabilidad térmica y la actividad catalítica de las enzimas puede proporcionar información valiosa para el desarrollo de nuevos inhibidores de betalactamasas.
- La identificación y seguimiento continuo de clones como CG258, ST11 y ST417, que tienen una alta capacidad de diseminación intrahospitalaria, son esenciales, por ello, futuras investigaciones deberían centrarse en mapear la propagación geográfica de estos clones y en identificar los factores que contribuyen a su éxito en distintas regiones, con el fin de diseñar estrategias de control más efectivas.
- La identificación y caracterización de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana a nivel genómico, permitirá realizar un análisis profundo del genoma de las cepas hipervirulentas, detectando variantes genéticas que contribuyan a su alta capacidad de causar enfermedades graves. Además, este enfoque facilitará la exploración de la evolución molecular y la dinámica de transmisión de estos patógenos, proporcionando información crucial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de vigilancia epidemiológica.

10.ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo prueba de NG-Carba 5

- a. Dispensar 5 gotas (150uL) de tampón de extracción en un tubo Eppendorf (incluido en el kit).
- b. En la placa de cultivo de agar sólido, tomar una colonia con un asa y suspenderla en el tubo que contiene 150uL de tampón de extracción
- c. Cerrar el tubo con el tapón
- d. Homogeneizar la mezcla con el vórtex.
- e. Tomar 100uL de la mezcla con la pipeta (hasta la línea demarcada en la pipeta)
- f. Dispensar los 100uL en el pozo de la muestra identificado como "S"
- g. Leer los resultados a los 15 minutos, no exceder tiempo de lectura.

11.REFERENCIAS

1. Corcione S, De Benedetto I, Shbaklo N, Torsello G, Lupia T, Bianco G, et al. Ceftazidime-Avibactam (C/A) Resistant, Meropenem Sensitive KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in ICU Setting: We Are What We Are Treated with? *Int J Mol Sci* [Internet]. el 1 de marzo de 2023 [citado el 14 de mayo de 2023];24(5):24. Disponible en: [/pmc/articles/PMC10002972/](https://pmc/articles/PMC10002972/)
2. Hansen GT. Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria. *Infect Dis Ther* [Internet]. el 1 de marzo de 2021 [citado el 7 de julio de 2023];10(1):75–92. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40121-020-00395-2>
3. Chen HY, Jean SS, Lee YL, Lu MC, Ko WC, Liu PY, et al. Carbapenem-Resistant Enterobacterales in Long-Term Care Facilities: A Global and Narrative Review. *Front Cell Infect Microbiol*. el 23 de abril de 2021;11:601968.
4. Remolina G. SA, Conde M. CE, Escobar C. JC, Leal C. AL, Bravo O. JS, Saavedra R. SY, et al. Tipos de carbapenemasas expresadas en *Klebsiella* spp., y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos en seis hospitales de alta complejidad de la Ciudad de Bogotá - Colombia. *Revista chilena de infectología* [Internet]. 2021 [citado el 7 de julio de 2023];38(5):720–3. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182021000500720&lng=es&nrm=iso&tlng=es
5. García-Betancur JC, Appel TM, Esparza G, Gales AC, Levy-Hara G, Cornistein W, et al. Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. <https://doi.org/10.1080/1478721020201813023> [Internet]. 2020 [citado el 7 de julio de 2023];19(2):197–213. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14787210.2020.1813023>
6. Dayana A, Carmen D, Restrepo F, Andrés C, Arias A. Resistencia a los antibióticos beta-lactámicos Carbapenems mediada por el gen blaKPC en *Klebsiella pneumoniae*. *RIAA*, ISSN-e 2145-6453, Vol 6, No 2, 2015, págs 109-118 [Internet]. 2015 [citado el 23 de septiembre de 2024];6(2):109–18. Disponible en:

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5628809&info=resumen&idioma=SPA>

7. 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* [Internet]. el 1 de octubre de 2017 [citado el 23 de septiembre de 2024];34(5):476–84. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182017000500476&lng=es&nrm=iso&tlng=es
8. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. el 1 de diciembre de 2014;32(S4):4–9.
9. Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee CR, et al. Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. *Int J Mol Sci* [Internet]. el 29 de abril de 2015 [citado el 6 de marzo de 2025];16(5):9654. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4463611/>
10. Lermينياux N, Mitchell R, Bartoszko J, Davis I, Ellis C, Fakharuddin K, et al. Plasmid genomic epidemiology of blaKPC carbapenemase-producing *Enterobacterales* in Canada, 2010–2021. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. el 1 de diciembre de 2023 [citado el 6 de marzo de 2025];67(12):e00860-23. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10720558/>
11. Dingle TC, MacCannell DR. Molecular Strain Typing and Characterisation of Toxigenic *Clostridium difficile*. *Methods in Microbiology*. el 1 de enero de 2015;42:329–57.
12. Liu N, Zheng X, Zhu Q, He Z, Hu S. The Dissemination of NDM-1 in *Acinetobacter baumannii* Strains. *Curr Microbiol* [Internet]. el 1 de abril de 2022 [citado el 25 de marzo de 2025];79(4). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35218435/>
13. Wailan AM, Paterson DL. The spread and acquisition of NDM-1: a multifactorial problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. enero de 2014 [citado el 25 de marzo de 2025];12(1):91–115. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/14787210.2014.856756>

14. Li X, Zhao D, Li W, Sun J, Zhang X. Enzyme Inhibitors: The Best Strategy to Tackle Superbug NDM-1 and Its Variants. *Int J Mol Sci* [Internet]. el 1 de enero de 2021 [citado el 25 de marzo de 2025];23(1):197. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8745225/>
15. Poirel L, Bonnin RA, Boulanger A, Schrenzel J, Kaase M, Nordmann P. Tn125-Related Acquisition of blaNDM-Like Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. febrero de 2012 [citado el 9 de septiembre de 2024];56(2):1087. Disponible en: [/pmc/articles/PMC3264265/](https://pmc/articles/PMC3264265/)
16. Instituto Nacional de Salud | Colombia searchDTC [Internet]. [citado el 10 de julio de 2023]. Disponible en: [https://www.ins.gov.co/Paginas/search.aspx?k=INFORME%20DE%20RESULTADOS%20DE%20LA%20VIGILANCIA%20POR%20LABORATORIO%20DE%20RESISTENCIA%20ANTIMICROBIAN%20EN%20INFECCIONES%20ASOCIADAS%20A%20LA%20ATENCI%C3%93N%20EN%20SALUD%20\(IAAS\)%202018](https://www.ins.gov.co/Paginas/search.aspx?k=INFORME%20DE%20RESULTADOS%20DE%20LA%20VIGILANCIA%20POR%20LABORATORIO%20DE%20RESISTENCIA%20ANTIMICROBIAN%20EN%20INFECCIONES%20ASOCIADAS%20A%20LA%20ATENCI%C3%93N%20EN%20SALUD%20(IAAS)%202018)
17. 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: blaKPC and the ‘changing landscape’. *J Glob Antimicrob Resist*. el 1 de junio de 2018;13:184–9.
18. Josa-Montero D, Yusef-Mejía S, Forero AJ, Leal R, Rojas J, Esparza G, et al. Colonización rectal por Enterobacteriales productores de múltiples carbapenemasas: Reporte de un caso de coproducción. *Infectio* [Internet]. el 1 de septiembre de 2021 [citado el 9 de marzo de 2024];25(3):193–6. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922021000300193&lng=en&nrm=iso&tlng=es
19. Sandra Yamile Saavedra Rojas. Vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas en atención en salud, 2012 al 2020 [Internet]. 2012 [citado el 23 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informacin%20de%20laboratorio/vigilancia-por-laboratorio-de-resistencia-antimicrobiana-en-iaas-en-colombia-a%C3%B1o-2016-a-2020.pdf>
20. Lucia Leal Castro A, Antonio Muñetón López G, Del Pilar Torres Navarrete M, Distrital Salud Yaniz Hernández S DE. Lineamientos

distritales para la vigilancia y contención de los VIVIAN MARCELA MORENO MEJÍA.

21. De La Cadena E, Pallares CJ, García-Betancur JC, Porras JA, Villegas MV. Actualización sobre la resistencia antimicrobiana en instituciones de salud de nivel III y IV en Colombia entre enero del 2018 y diciembre del 2021. *Biomédica* [Internet]. 2023 [citado el 8 de septiembre de 2024];43(4):457. Disponible en: </pmc/articles/PMC10826464/>
22. Li Y, Kumar S, Zhang L, Wu H, Wu H. Characteristics of antibiotic resistance mechanisms and genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Open Medicine* [Internet]. el 1 de enero de 2023 [citado el 18 de julio de 2023];18(1). Disponible en: </pmc/articles/PMC10183727/>
23. Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med* [Internet]. el 1 de junio de 2017 [citado el 15 de mayo de 2023];37(2):303. Disponible en: </pmc/articles/PMC5412586/>
24. Grabowski ME, Kang H, Wells KM, Sifri CD, Mathers AJ, Lobo JM. Provider role in transmission of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae. *Infect Control Hosp Epidemiol*. el 1 de noviembre de 2017;38(11):1329–34.
25. Nwafia IN, Ike AC, Orabueze IN, Nwafia WC. Carbapenemase producing Enterobacteriaceae: Environmental reservoirs as primary targets for control and prevention strategies. *Niger Postgrad Med J* [Internet]. el 1 de julio de 2022 [citado el 9 de julio de 2023];29(3):183–91. Disponible en: https://journals.lww.com/npmj/Fulltext/2022/29030/Carbapenemase_Producing_Enterobacteriaceae_2.aspx
26. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. el 1 de diciembre de 2014 [citado el 15 de mayo de 2023];32(S4):4–9. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X14701685>
27. Villegas MV, Pallares CJ, Escandón-Vargas K, Hernández-Gómez C, Correa A, Álvarez C, et al. Characterization and Clinical Impact of Bloodstream Infection Caused by Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Seven Latin American Countries. *PLoS One* [Internet]. el 1 de abril de 2016 [citado el 9 de marzo de 2024];11(4). Disponible en: </pmc/articles/PMC4841576/>

28. Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. el 1 de agosto de 2011 [citado el 10 de julio de 2023];29(7):524–34. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-deteccion-fenotipica-mecanismos-resistencia-microorganismos-S0213005X11001546>
29. Lee YL, Chen HM, Hii IM, Hsueh PR. Carbapenemase-producing Enterobacterales infections: recent advances in diagnosis and treatment. *Int J Antimicrob Agents*. el 1 de febrero de 2022;59(2):106528.
30. Falco Restrepo AD del C, Aranaga Arias CA. Resistencia a los antibióticos beta-lactámicos Carbapenems mediada por el gen blaKPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. el 15 de diciembre de 2015;6(2):109.
31. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis* [Internet]. el 4 de abril de 2018 [citado el 9 de julio de 2023];66(8):1290. Disponible en: [/pmc/articles/PMC5884739/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30044441/)
32. Li Y, Kumar S, Zhang L, Wu H, Wu H. Characteristics of antibiotic resistance mechanisms and genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Open Medicine (Poland)* [Internet]. el 1 de enero de 2023 [citado el 10 de julio de 2023];18(1). Disponible en: [/pmc/articles/PMC10183727/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39844441/)
33. Garcia-Fulgueiras V, Zapata Y, Papa-Ezdra R, Ávila P, Caiata L, Seija V, et al. First characterization of *K. pneumoniae* ST11 clinical isolates harboring blaKPC-3 in Latin America. *Rev Argent Microbiol*. el 1 de julio de 2020;52(3):211–6.
34. Li J, Wu W, Wu H, Huang J, Li Z, Wang J, et al. Rapid emergence, transmission, and evolution of KPC and NDM coproducing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Res*. el 1 de abril de 2025;293:128049.
35. Liu H, Xiang Y, Xiong M, Xiao X, Zhou J, Tian H, et al. Prevalence of ST1049-KL5 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with a blaKPC-2 and blaNDM-1 co-carrying hypertransmissible IncM1 plasmid. *Commun Biol* [Internet]. el 1 de diciembre de 2024 [citado el 23 de marzo de 2025];7(1):695. Disponible en: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11156905/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/46844441/)

36. Karampatakis T, Tsergouli K, Behzadi P. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options. *Antibiotics* [Internet]. el 1 de febrero de 2023 [citado el 23 de marzo de 2025];12(2):234. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9952820/>
37. Ke W, Bethel CR, Thomson JM, Bonomo RA, Van Den Akker F. Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in Class A β -lactamases. *Biochemistry* [Internet]. el 15 de mayo de 2007 [citado el 23 de marzo de 2025];46(19):5732. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2596071/>
38. Ramos-Castañeda JA, Ruano-Ravina A, Barbosa-Lorenzo R, Paillier-Gonzalez JE, Saldaña-Campos JC, Salinas DF, et al. Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis: Mortality due to KPC *Klebsiella pneumoniae* infections. *Journal of Infection* [Internet]. el 1 de mayo de 2018 [citado el 15 de marzo de 2025];76(5):438–48. Disponible en: <https://www.journalofinfection.com/action/showFullText?pii=S0163445318300604>
39. Li J, Wu W, Wu H, Huang J, Li Z, Wang J, et al. Rapid emergence, transmission, and evolution of KPC and NDM coproducing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Res.* el 1 de abril de 2025;293:128049.
40. Hobson CA, Pierrat G, Tenaillon O, Bonacorsi S, Bercot B, Jaouen E, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Variants Resistant to Ceftazidime-Avibactam: an Evolutionary Overview. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. el 1 de septiembre de 2022 [citado el 23 de marzo de 2025];66(9):e00447-22. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9487638/>
41. Fontana C, Favaro M, Campogiani L, Malagnino V, Minelli S, Bossa MC, et al. Ceftazidime/Avibactam-Resistant *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* Isolates in a Tertiary Italian Hospital: Identification of a New Mutation of the Carbapenemase Type 3 (KPC-3) Gene Conferring Ceftazidime/Avibactam Resistance. *Microorganisms* [Internet]. el 1 de noviembre de 2021 [citado el 9 de julio de 2023];9(11). Disponible en: [/pmc/articles/PMC8624296/](https://pmc/articles/PMC8624296/)
42. Galdadas I, Lovera S, Pérez-Hernández G, Barnes MD, Healy J, Afsharikho H, et al. Defining the architecture of KPC-2 Carbapenemase: identifying allosteric networks to fight antibiotics

- resistance. *Sci Rep* [Internet]. el 1 de diciembre de 2018 [citado el 11 de mayo de 2025];8(1):1–13. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-31176-0>
43. Nicolau CJ, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. el 1 de enero de 2010 [citado el 10 de julio de 2023];28(SUPPL. 1):19–28. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-carbapenemasas-especies-del-genero-pseudomonas-S0213005X10700045>
 44. Achmad Ali Fikri, Syamsul Arifin MFF. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022. World Health Organization. 2022;2(8.5.2017):2003–5.
 45. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. el 1 de abril de 2019 [citado el 12 de mayo de 2025];32(2). Disponible en: [/doi/pdf/10.1128/cmr.00115-18?download=true](https://doi.org/10.1128/cmr.00115-18?download=true)
 46. Giannini E. Estudio bioquímico y estructural de la metalo-beta-lactamasa NDM-1: residuos de segunda esfera e implicancias de su anclaje a membrana [Internet]. 2019 [citado el 12 de mayo de 2025]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2133/21483>
 47. OPS/OMS. Reunión de la Red Latinoamericana y del Caribe para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA+) - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado el 23 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/reunion-red-latinoamericana-caribe-para-vigilancia-resistencia-antimicrobianos-relavra>
 48. Alerta Epidemiológica: Emergencia e incremento de nuevas combinaciones de carbapenemasas en Enterobacterales en Latinoamérica y el Caribe - 22 Octubre 2021 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado el 10 de julio de 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-emergencia-e-incremento-nuevas-combinaciones-carbapenemasas>
 49. Estratégico P. PLAN NACIONAL DE RESPUESTA A LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS. 2018 [citado el 23 de septiembre de 2024]; Disponible en:

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/MET/plan-respuesta-resistencia-antimicrobianos.pdf>

50. Instrumento BD Phoenix™ M50 | BD [Internet]. [citado el 14 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.bd.com/es-latam/products-and-solutions/products/product-families/bd-phoenix-m50-instrument>
51. Carba 5 Test - CARBAPENEMASE RESISTANCE DETECTION - [Internet]. [citado el 14 de diciembre de 2024]. Disponible en: <https://www.ngbiotech.com/ng-test-carba-5/>
52. Shin SK, Lee Y, Kwon H, Rhee JS, Kim JK. Validation of Direct Boiling Method for Simple and Efficient Genomic DNA Extraction and PCR-based Macroalgal Species Determination. *J Phycol* [Internet]. el 1 de agosto de 2021 [citado el 14 de diciembre de 2024];57(4):1368–72. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpy.13175>
53. Mullis KB, Faloona FA. [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* el 1 de enero de 1987;155(C):335–50.
54. Eisenstein BI. The Polymerase Chain Reaction. *N Engl J Med* [Internet]. el 18 de enero de 1990 [citado el 14 de diciembre de 2024];322(3):178–83. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199001183220307>
55. Schechner V, Straus-Robinson K, Schwartz D, Pfeffer I, Tarabeia J, Moskovich R, et al. Evaluation of PCR-Based Testing for Surveillance of KPC-Producing Carbapenem-Resistant Members of the Enterobacteriaceae Family. *J Clin Microbiol* [Internet]. octubre de 2009 [citado el 23 de septiembre de 2024];47(10):3261. Disponible en: [/pmc/articles/PMC2756929/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21398074/)
56. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2011 [citado el 23 de septiembre de 2024];70(1):119–23. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21398074/>
57. Tiemtoré RYW, Dabiré AM, Ouermi D, Sougué S, Benao S, Simporé J. Isolation and Identification of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains Resistant to the Oxyimino-Cephalosporins and the Monobactam by Production of GES Type Extended Spectrum Bêta-Lactamase (ESBL) at Saint Camille Hospital Center in Ouagadougou, Burkina Faso. *Infect Drug Resist*

- [Internet]. 2022 [citado el 23 de septiembre de 2024];15:3191–204. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35754782/>
58. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes JC, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* 1977 265:5596 [Internet]. 1977 [citado el 9 de marzo de 2025];265(5596):687–95. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/265687a0>
 59. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 409:6822 [Internet]. el 1 de febrero de 2001 [citado el 9 de marzo de 2025];409(6822):860–921. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/35057062>
 60. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. el 17 de marzo de 1998 [citado el 14 de diciembre de 2024];95(6):3140. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC19708/>
 61. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *J Clin Microbiol* [Internet]. agosto de 2005 [citado el 14 de diciembre de 2024];43(8):4178. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1233940/>
 62. Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, de Maio N, Moore CE, Sebra R, et al. Evolutionary History of the Global Emergence of the *Escherichia coli* Epidemic Clone ST131. *mBio* [Internet]. el 22 de marzo de 2016 [citado el 14 de diciembre de 2024];7(2):e02162-15. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4807372/>
 63. Arabaghian H, Salloum T, Alousi S, Panossian B, Araj GF, Tokajian S. Molecular Characterization of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella quasipneumoniae* Isolated from Lebanon. *Scientific Reports* 2019 9:1 [Internet]. el 24 de enero de 2019 [citado el 15 de mayo de 2023];9(1):1–12. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-018-36554-2>
 64. Stoesser N, Sheppard AE, Peirano G, Anson LW, Pankhurst L, Sebra R, et al. Genomic epidemiology of global *Klebsiella*

- pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*. *Sci Rep*. el 1 de diciembre de 2017;7(1):2.
65. Ghasemnejad A, Doudi M, Amirmozafari N. The role of the blaKPC gene in antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Microbiol* [Internet]. el 1 de agosto de 2019 [citado el 14 de mayo de 2023];11(4):288. Disponible en: [/pmc/articles/PMC6829112/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6829112/)
 66. Evaluación Rápida de Riesgo para la salud pública relacionada con *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta portadora de genes de carbapenemasas en la Región de las Américas - 20 marzo de 2024 - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado el 15 de marzo de 2025]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/evaluacion-rapida-riesgo-para-salud-publica-relacionada-con-klebsiella-pneumoniae>
 67. Elmanakhly AR, Bendary MM, Safwat NA, Awad EAE, Alhomrani M, Alamri AS, et al. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Diversity, Virulence, and Antimicrobial Resistance. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2022 [citado el 22 de marzo de 2025];15:6177. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9597670/>
 68. Chatzidimitriou M, Kavvada A, Kavvadas D, Kyriazidi MA, Eleftheriadis K, Varlamis S, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the Balkans: Clonal distribution and associated resistance determinants. *Acta Microbiol Immunol Hung* [Internet]. el 21 de febrero de 2024 [citado el 22 de marzo de 2025];71(1):10–24. Disponible en: <https://akjournals.com/view/journals/030/71/1/article-p10.xml>
 69. Chen YT, Lin JC, Fung CP, Lu PL, Chuang YC, Wu TL, et al. KPC-2-encoding plasmids from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *J Antimicrob Chemother*. marzo de 2014;69(3):628–31.
 70. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis*. 2017;215:S28–36.
 71. Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* complex emerging as a global, diversifying threat. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [citado el 15 de marzo de 2025];10(JAN):44. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6365427/>

72. Wendel AF, Peter D, Mattner F, Weiss M, Hoppenz M, Wolf S, et al. Surveillance of *Enterobacter cloacae* complex colonization and comparative analysis of different typing methods on a neonatal intensive care unit in Germany. *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. el 1 de diciembre de 2022 [citado el 15 de marzo de 2025];11(1):54. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8973561/>
73. Yeh TK, Lin HJ, Liu PY, Wang JH, Hsueh PR. Antibiotic resistance in *Enterobacter hormaechei*. *Int J Antimicrob Agents*. el 1 de octubre de 2022;60(4):106650.
74. Peirano G, Matsumura Y, Adams MD, Bradford P, Motyl M, Chen L, et al. Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp., 2008–2014 - Volume 24, Number 6—June 2018 - *Emerging Infectious Diseases* journal - CDC. *Emerg Infect Dis* [Internet]. el 1 de junio de 2018 [citado el 19 de marzo de 2025];24(6):1010–9. Disponible en: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/6/17-1648_article
75. Cao Z, Cui L, Liu Q, Liu F, Zhao Y, Guo K, et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Multidrug-Resistant *Enterobacter hormaechei* Carrying *qnrS* Gene Isolated from Chicken Feed in China . *Microbiol Spectr* [Internet]. el 29 de junio de 2022 [citado el 11 de mayo de 2025];10(3). Disponible en: [/doi/pdf/10.1128/spectrum.02518-21?download=true](https://doi/pdf/10.1128/spectrum.02518-21?download=true)
76. Ba X, Guo Y, Moran RA, Doughty EL, Liu B, Yao L, et al. Global emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Escherichia coli* ST410 clone. *Nat Commun* [Internet]. el 1 de diciembre de 2024 [citado el 11 de mayo de 2025];15(1):494. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10786849/>
77. Li Y, Sun X, Dong N, Wang Z, Li R. Global distribution and genomic characteristics of carbapenemase-producing *Escherichia coli* among humans, 2005–2023. *Drug Resistance Updates* [Internet]. el 1 de enero de 2024 [citado el 11 de mayo de 2025];72:101031. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1368764623001140?via%3Dihub>
78. Kubiak JM, Hovan M, Davidson E, Douglass C, Burgos K, Walsh TJ, et al. Comparison between Perianal Swab and Stool Specimens for Detecting Colonization with Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing and Fluoroquinolone-Resistant

Enterobacterales. J Clin Microbiol [Internet]. el 1 de julio de 2022 [citado el 11 de mayo de 2025];60(7):1DUNNY. Disponible en: [/doi/pdf/10.1128/jcm.00234-22?download=true](https://doi/pdf/10.1128/jcm.00234-22?download=true)

79. Piatti G, Schito AM, Vitale A, Bruzzzone M, Ceppi M. Improved isolation of carbapenem-resistant Enterobacterales on selective-differential media extending the incubation time: an approach to strengthen the antimicrobial surveillance from rectal swabs. Journal of Hospital Infection [Internet]. el 1 de noviembre de 2022 [citado el 11 de mayo de 2025];129:102–9. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670122001840>
80. Fernandes-Pineda M, Martínez-Buitrago E, Bravo JH, Matta-Cortés L, Ospina-Galindez JA, Paredes-Amaya CC. Characterization of carbapenemase-producing Enterobacterales from rectal swabs of patients in the intensive care units of a tertiary hospital in Cali-Colombia. Heliyon [Internet]. el 30 de junio de 2024 [citado el 11 de mayo de 2025];10(12):e33368. Disponible en: <https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S240584402409399X>
81. Adekanmbi O, Popoola O, Fowotade A, Idowu O, Ogunbosi B, Lakoh S, et al. Prevalence of rectal carbapenem resistant Enterobacterales carriage among patients attending healthcare facilities in Ibadan, Nigeria: a descriptive study. BMC Infect Dis [Internet]. el 1 de diciembre de 2024 [citado el 11 de mayo de 2025];24(1):1–9. Disponible en: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12879-024-09627-z>
82. Gatti M, Cojutti PG, Pea F. Piperacillin-tazobactam vs. carbapenems for treating hospitalized patients with ESBL-producing Enterobacterales bloodstream infections: A systematic review and meta-analysis. J Glob Antimicrob Resist [Internet]. el 1 de diciembre de 2024 [citado el 11 de mayo de 2025];39:27–36. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213716524001541>
83. Rodrigues D, Baldissera GS, Mathos D, Sartori A, Zavascki AP, Rigatto MH. Amikacin for the treatment of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infections: clinical efficacy and toxicity. Brazilian Journal of Microbiology [Internet]. el 1 de diciembre de 2021 [citado el 11 de mayo de 2025];52(4):1913. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8578526/>

84. Wang Y, Yu L, Zhu J, Liang G, Liu J, Zheng Y, et al. Cost-effectiveness analysis of polymyxin B versus colistin for treating patients with carbapenem-resistant gram-negative bacterial infections. *Scientific Reports* 2024 14:1 [Internet]. el 9 de octubre de 2024 [citado el 11 de mayo de 2025];14(1):1–10. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-74290-y>
85. Shatri G, Tadi P. Polymyxin. el 4 de julio de 2023 [citado el 11 de mayo de 2025]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557540/>
86. Silver LL. Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. el 1 de febrero de 2017 [citado el 11 de mayo de 2025];7(2):a025262. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5287057/>
87. Ni W, Han Y, Liu J, Wei C, Zhao J, Cui J, et al. Tigecycline Treatment for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine* [Internet]. 2016 [citado el 11 de mayo de 2025];95(11):e3126. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4839946/>
88. Chirabhundhu N, Luk-In S, Phuadraksa T, Wichit S, Chatsuwat T, Wannigama DL, et al. Occurrence and mechanisms of tigecycline resistance in carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Thailand. *Scientific Reports* 2024 14:1 [Internet]. el 3 de marzo de 2024 [citado el 11 de mayo de 2025];14(1):1–13. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-55705-2>
89. Greer ND. Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylcycline class of antibiotics. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* [Internet]. abril de 2006 [citado el 11 de mayo de 2025];19(2):155. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1426172/>
90. Xiong L, Wang X, Wang Y, Yu W, Zhou Y, Chi X, et al. Molecular mechanisms underlying bacterial resistance to ceftazidime/avibactam. *Wires Mechanisms of Disease* [Internet]. el 1 de noviembre de 2022 [citado el 23 de marzo de 2025];14(6):e1571. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9788277/>
91. Hobson CA, Pierrat G, Tenailon O, Bonacorsi S, Bercot B, Jaouen E, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Variants Resistant to Ceftazidime-Avibactam: an Evolutionary Overview. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. el 1 de septiembre de 2022 [citado el

23 de marzo de 2025];66(9):e00447-22. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9487638/>

92. Cui Q, Wang C, Wang Q, Qin J, Li M, Ding B, et al. Ceftazidime/Avibactam Resistance in Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Infect Dis* [Internet]. el 1 de noviembre de 2023 [citado el 23 de marzo de 2025];29(11):2398. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10617341/>
93. Xiong L, Wang X, Wang Y, Yu W, Zhou Y, Chi X, et al. Molecular mechanisms underlying bacterial resistance to ceftazidime/avibactam. *Wires Mechanisms of Disease* [Internet]. el 1 de noviembre de 2022 [citado el 23 de marzo de 2025];14(6):e1571. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9788277/>
94. Wang Y, Wang J, Wang R, Cai Y. Resistance to ceftazidime–avibactam and underlying mechanisms. *J Glob Antimicrob Resist*. el 1 de septiembre de 2020;22:18–27.
95. Vasilakopoulou A, Karakosta P, Vourli S, Kalogeropoulou E, Pournaras S. Detection of KPC, NDM and VIM-Producing Organisms Directly from Rectal Swabs by a Multiplex Lateral Flow Immunoassay. *Microorganisms* [Internet]. el 1 de mayo de 2021 [citado el 23 de marzo de 2025];9(5):942. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8146855/>
96. Nagulapalli Venkata KC, Ellebrecht M, Tripathi SK. Efforts towards the inhibitor design for New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1). *Eur J Med Chem*. el 5 de diciembre de 2021;225:113747.
97. García-Fernández S, Rodríguez-Grande J, Siller-Ruiz M, Fraile-Valcárcel N, Lara-Plaza I, Moure Z, et al. Within-host transition to GES-55 during a GES-6-producing *Serratia marcescens* outbreak: Emergence of ceftazidime-avibactam resistance and increased susceptibility to carbapenems. *Int J Antimicrob Agents*. el 1 de agosto de 2024;64(2):107257.
98. Martínez-Zavaleta MG, Fernández-Rodríguez D, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, de Lourdes García-Hernández M, Becerra-Lobato N, et al. Acquired blaVIM and blaGES Carbapenemase-Encoding Genes in *Pseudomonas aeruginosa*: A Seven-Year Survey Highlighting an Increasing Epidemiological Threat. *Pathogens* [Internet]. el 1 de octubre de 2023 [citado el 23

de marzo de 2025];12(10):1256. Disponible en:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10610504/>

99. Takizawa S, Soga E, Hayashi W, Sakaguchi K, Koide S, Tanabe M, et al. Genomic landscape of blaGES-5- and blaGES-24-harboring Gram-negative bacteria from hospital wastewater: emergence of class 3 integron-associated blaGES-24 genes. *J Glob Antimicrob Resist*. el 1 de diciembre de 2022;31:196–206.
100. Ofosu-Appiah F, Acquah EE, Mohammed J, Sakyi Addo C, Agbodzi B, Ofosu DAS, et al. Klebsiella pneumoniae ST147 harboring blaNDM-1, multidrug resistance and hypervirulence plasmids. *Microbiol Spectr* [Internet]. el 5 de marzo de 2024 [citado el 11 de mayo de 2025];12(3):e03017-23. Disponible en:
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10913492/>
101. Aguilar-Ancori EG, Marin-Carrasco M, Campo-Pfuyo LI, Muñiz-Duran JG, Espinoza-Culupú A. Identification of pandemic ST147, ESBL-type β -lactamases, carbapenemases, and virulence factors in Klebsiella pneumoniae isolated from southern Peru. *Scientific Reports* 2025 15:1 [Internet]. el 28 de abril de 2025 [citado el 11 de mayo de 2025];15(1):1–15. Disponible en:
<https://www.nature.com/articles/s41598-025-97464-8>
102. Elgayar FA, Gouda MK, Badran AA, El Halfawy NM. Pathogenomics analysis of high-risk clone ST147 multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae isolated from a patient in Egypt. *BMC Microbiol* [Internet]. el 1 de diciembre de 2024 [citado el 11 de mayo de 2025];24(1):1–14. Disponible en:
<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-024-03389-z>
103. Kochan TJ, Nozick SH, Medernach RL, Cheung BH, Gatesy SWM, Lebrun-Corbin M, et al. Genomic surveillance for multidrug-resistant or hypervirulent Klebsiella pneumoniae among United States bloodstream isolates. *BMC Infect Dis* [Internet]. el 1 de diciembre de 2022 [citado el 11 de mayo de 2025];22(1):1–21. Disponible en:
<https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-022-07558-1>
104. López S, Porte L, Weitzel T, López S, Porte L, Weitzel T. Klebsiella pneumoniae hipervirulenta. *Revista chilena de infectología* [Internet]. el 1 de diciembre de 2020 [citado el 22 de marzo de 2025];37(6):739–40. Disponible en:

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182020000600739&lng=es&nrm=iso&tlng=es

105. Qiao S, Xin S, Zhu Y, Zhao F, Wu H, Zhang J, et al. A large-scale surveillance revealed that KPC variants mediated ceftazidime-avibactam resistance in clinically isolated *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiol Spectr* [Internet]. el 6 de agosto de 2024 [citado el 15 de marzo de 2025];12(8):e00258-24. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11302327/>
106. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2001 [citado el 15 de diciembre de 2024];45(4):1151–61. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11257029/>
107. Garcia-Fulgueiras V, Zapata Y, Papa-Ezdra R, Ávila P, Caiata L, Seija V, et al. First characterization of *K. pneumoniae* ST11 clinical isolates harboring blaKPC-3 in Latin America. *Rev Argent Microbiol*. el 1 de julio de 2020;52(3):211–6.
108. Moghnia OH, Rotimi VO, Al-Sweih NA. Preponderance of blaKPC-Carrying Carbapenem-Resistant Enterobacterales Among Fecal Isolates From Community Food Handlers in Kuwait. *Front Microbiol*. el 14 de octubre de 2021;12:737828.
109. Xie Z, Jian J, Chen L. Epidemiology and Mechanism of Drug Resistance of Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Patients with Urinary Tract Infection in Beijing Teaching Hospital, China. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2025 [citado el 24 de marzo de 2025];18:135. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11721333/>
110. Centonze AR, Azzini AM, Mazzi R, Merighi M, Concia E, Mazzariol A. *Klebsiella pneumoniae* (ST1519) producing KPC-19 carbapenemase in a patient undergoing selective digestive decontamination before liver transplantation. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. el 1 de febrero de 2018 [citado el 15 de diciembre de 2024];24(2):203–4. Disponible en: <http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X1730455X/fulltext>
111. Centonze AR, Azzini AM, Mazzi R, Merighi M, Concia E, Mazzariol A. *Klebsiella pneumoniae* (ST1519) producing KPC-19 carbapenemase in a patient undergoing selective digestive

- decontamination before liver transplantation. *Clinical Microbiology and Infection* [Internet]. el 1 de febrero de 2018 [citado el 24 de marzo de 2025];24(2):203–4. Disponible en: <https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/action/showFullText?pii=S1198743X1730455X>
112. Wang C, Sun Z, Hu Y, Li D, Guo Q, Wang M. A Novel Anti-CRISPR AcrIE9.2 Is Associated with Dissemination of blaKPC Plasmids in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 15. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. el 18 de abril de 2023 [citado el 14 de mayo de 2023];67(4):e0154722. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.01547-22>
 113. Rodrigues C, Machado E, Ramos H, Peixe L, Novais Â. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: A successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIK). *Int J Med Microbiol*. el 1 de noviembre de 2014;304(8):1100–8.
 114. Zaragoza G, Pérez-Vázquez M, Villar-Gómara L, González-Prieto A, Oteo-Iglesias J, Alós JI. Community Emergence of Cefixime-Resistant *Escherichia coli* Belonging to ST12 with Chromosomal AmpC Hyperproduction. *Antibiotics* [Internet]. el 1 de marzo de 2024 [citado el 24 de marzo de 2025];13(3):218. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10967553/>
 115. Giufrè M, Errico G, Monaco M, Del Grosso M, Sabbatucci M, Pantosti A, et al. Whole Genome Sequencing and Molecular Analysis of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* from Intestinal Carriage in Elderly Inpatients. *Microorganisms* [Internet]. el 1 de agosto de 2022 [citado el 24 de marzo de 2025];10(8). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36013979/>
 116. Rayasam SDG, Ray I, Smith KR, Riley LW. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* and Antimicrobial Drug Resistance in a Maharashtrian Drinking Water System. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2019 [citado el 24 de marzo de 2025];100(5):1101. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6493927/>
 117. Nesporova K, Wyrsh ER, Valcek A, Bitar I, Chaw K, Harris P, et al. *Escherichia coli* Sequence Type 457 Is an Emerging Extended-Spectrum- β -Lactam-Resistant Lineage with Reservoirs in Wildlife and Food-Producing Animals. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. el 1 de enero de 2020 [citado el 24 de marzo de 2025];64(1):e01982-20. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/aac.01982-20>

2025];65(1). Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33020161/>

118. Wang M, Jiang M, Wang Z, Chen R, Zhuge X, Dai J. Characterization of antimicrobial resistance in chicken-source phylogroup F *Escherichia coli*: similar populations and resistance spectrums between *E. coli* recovered from chicken colibacillosis tissues and retail raw meats in Eastern China. *Poult Sci.* el 1 de septiembre de 2021;100(9):101370.
119. Lee JH, Tareen AR, Kim NH, Jeong C, Kang B, Lee G, et al. Complete genome sequence of a high-risk *Escherichia coli* ST10 isolated from avian feces in Pakistan. Rasko D, editor. *Microbiol Resour Announc* [Internet]. el 12 de noviembre de 2024 [citado el 24 de marzo de 2025];13(11):e00769-24. Disponible en: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11556057/>
120. Bojesen AM, Ahmed U, Skaarup H, Espinosa-Gongora C. Recurring outbreaks by the same *Escherichia coli* ST10 clone in a broiler unit during 18 months. *Vet Res* [Internet]. el 9 de enero de 2022 [citado el 24 de marzo de 2025];53(1):2. Disponible en: <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-021-01017-6>
121. Cardenas-Arias AR, Sano E, Cardoso B, Fuga B, Sellera FP, Esposito F, et al. Genomic data of global clones of CTX-M-65-producing *Escherichia coli* ST10 from South American llamas inhabiting the Andean Highlands of Peru. *J Glob Antimicrob Resist.* el 1 de marzo de 2024;36:135–8.