

Departamento de Microbiología y Ecología
Programa de Doctorado 3139 Medicina:
Microbiología

Tesis
Doctoral

Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenems

PRESENTADA POR:

Begoña Fuster Escrivá

Graduada en Farmacia

DIRIGIDA POR:

Carme Salvador García

Nuria Tormo Palop


Concepción Gimeno Cardona



Valencia, Septiembre 2022



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

() Facultat de
Medicina y Odontología



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología y Ecología
Programa de Doctorado 3139 Medicina: Microbiología

TESIS DOCTORAL

“Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenems.”

Begoña Fuster Escrivá

Graduada en Farmacia

Dirigida por:

Carme Salvador García

Nuria Tormo Palop

Concepción Gimeno Cardona

Valencia, Septiembre 2022

“El cerebro necesita emocionarse para aprender”

*“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.
Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es
también un niño colocado ante fenómenos naturales que le
impresionan como un cuento de hadas”.*

Marie Curie

D. CONCEPCIÓN GIMENO CARDONA, Doctora en Microbiología, Jefa de Servicio de Microbiología en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia y profesora titular del departamento de Microbiología y Parasitología en la Facultad de Medicina (Universitat de València).

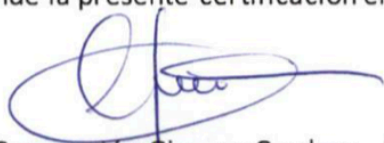
D. CARME SALVADOR GARCÍA, Doctora en Microbiología, Facultativo Especialista Adjunta en Microbiología en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

D. NURIA TORMO PALOP, Doctora en Microbiología, Facultativo Especialista Adjunta en Microbiología en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la presente tesis doctoral titulada "**Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenems**" ha sido realizada por Dña. BEGOÑA FUSTER ESCRIVÁ bajo nuestra dirección y reúne los requisitos científicos y formales para la obtención del título de Doctora por la Universitat de València.

Para que así conste a los efectos legales oportunos, se presenta esta tesis doctoral y se extiende la presente certificación en València, a 10 de Julio de 2022.



Dra. Concepción Gimeno Cardona



Dra. Carme Salvador García



Dra. Nuria Tormo Palop

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quería agradecerle a Concha Gimeno, mi Jefa de Servicio y también directora, por haberme permitido realizar esta tesis doctoral, pero sobre todo, por haber sido mi mentora todos estos años. Ha sido y sigue siendo un placer.

A mis otras directoras, Carme Salvador y Nuria Tormo, por haberme guiado y ayudado siempre.

Gracias a todos los que me habéis dedicado una sonrisa por el camino.

Durante los años que ha durado esta aventura he ido creciendo y madurando a nivel personal y profesional. Mentiría si dijera que soy la misma que empezó a insistir con hacer la tesis ya el primer año de residencia. Supongo que por eso esto es tan especial para mí, porque ha sido el proyecto de “mi personita” y por fin le he dado forma y una portada bonita, así que ojalá consiga ilusionar a alguien tanto como me ha ilusionado a mí. Ahí va:

Este trabajo es el resultado final de una etapa de mi vida que, sin duda, marca un antes y un después. Han sido años intensos, llenos de motivación, dedicación y sacrificio, pero como siempre dice mi abuela: *“Faena a gust, no pesa”*; y es que si me preguntaran dónde me veo el resto de mi vida, diría sin pensar dos veces: “En una bancada de laboratorio enterita para mí.”

Abuelo, ojalá estuvieras aquí para verme. Gracias por transmitirme lo que me ha hecho llegar hasta aquí: la pasión por tu trabajo, la curiosidad y las ganas de aprender. Fuiste mi referencia como investigador, y me dejaste participar desde pequeñita (aunque solo fuera nivelando la báscula de precisión) de lo que un día decías que yo haría sola. Dicen que lo que muere es aquello que no se recuerda, que lo que se recuerda sigue vivo; así que abu, hoy en día me sigues acompañando. Mamá y yo te echamos mucho de menos. Esto es para ti.

Gracias a toda la gente de Micro, a mis super resis, mis adjuntos, técnicos y enfermeros... por las veces en las que no podía más y me habéis dado un empujoncito; por

todos los favores: “¿Me sacas las placas de la estufa?”, “Bego, te he traído un *tupper*...”; sois geniales, ha sido como un *summer camp* fantástico de cuatro años. Sólo me salen sonrisas cuando lo recuerdo.

No puedo olvidarme de mi paso por Suiza, los meses más fríos y divertidos que he pasado en mucho tiempo. De allí me llevo la dedicación y la constancia que tanto me impresionó cuando llegué. Tampoco me olvido de mi paso por FISABIO, dos meses que compartí con doctorandos geniales, que me ayudaron siempre a cambio de nada. He tenido la suerte de coincidir con grandes profesionales que, además, son grandes personas. José Manuel, Ángel, Juli, Nico, Lindi, Cristoph, Claudine... Neris, Bea, Fernando...

GRACIAS.

A Manu, por ser el mejor co-R que podría haber tenido.

A Isa, por aguantarme y por compartir las alegrías y las penas durante estos cuatro años.

A Merche, por cuidarme tanto.

A Sofía y a Elena que, aunque ellas todavía no lo sepan, han llenado la casa de alegría.

A toda mi familia, por confiar siempre tan ciegamente en mí.

Mamá, a ti especialmente: por darme alas, lanzarme a volar, y animarme siempre a hacerlo más alto. Por aguantarme en mis días grises, por dedicarme tu tiempo y por ser incondicional. Somos el mejor equipo mami.

A mis farmas, por las innumerables noches de *afterwork*, por las risas, y por seguir tan unidos diez años después.

A mis amigas, por las cenas de sonrisas y lágrimas un martes cualquiera. Por los vinitos anti-agobios y los planes “de tranquis” que ya sabemos cómo acaban. Por seguir manteniendo nuestra esencia 30 años después. Por los *facetimes* con las que estáis lejos. Por apoyarme en todas las cosas que me propongo y por quererme tanto. Sois mi terapia.

Pero, sobre todo, gracias a Andrés, por haber formado parte de esta tesis de principio a fin, aun sin saberlo. Gracias por demostrarme que juntos somos un gran equipo. Por las incontables horas en el estudio, y el vinito de antes de cenar. Te quiero infinito.

Escribiendo los agradecimientos me he dado cuenta de que, a parte de ser una rollera, tengo mucha suerte de estar rodeada de mi gente. Espero no haberme olvidado de nadie, pero por si las moscas, GRACIAS, GRACIAS Y GRACIAS.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	9
ÍNDICE	13
ABREVIATURAS	17
ÍNDICE DE FIGURAS	21
ÍNDICE DE TABLAS	25
Resumen	27
I. Introducción	43
1. Género <i>Klebsiella</i>: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
1.1. Perspectiva histórica y taxonomía	45
1.2. Características microbiológicas y hábitat	47
1.2.1. Reservorio ambiental	49
1.2.2. Reservorio humano	50
1.3. Factores de virulencia en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	51
1.4. Importancia clínica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	56
2. Resistencia a antimicrobianos en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	61
2.1. Mecanismos generales de resistencia antibiótica	61
2.2. Resistencia a antimicrobianos β -lactámicos	63
2.3. Resistencia a antimicrobianos no β -lactámicos	68
2.4. Elementos genéticos móviles portadores de mecanismos de resistencia	72
2.5. Epidemiología de la resistencia antibiótica en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	75
3. Caracterización molecular de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	79
3.1. Tipificación de los aislados	79
3.1.1. Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Electroforesis en campo pulsante (PFGE)	80
3.1.2. Análisis del ADN por secuenciación: Multilocus sequence typing (MLST)	82
4. Secuenciación del genoma completo	85
4.1. Secuenciación de primera generación: Sanger	86
4.2. Secuenciación de segunda generación: Masiva	87
4.3. Análisis bioinformático	91
4.3.1. Alineamiento y análisis de variantes	91
4.3.2. Ensamblaje <i>de novo</i>	91
4.3.3. Anotación genómica	92
4.3.4. Detección de mecanismos de resistencia	92
4.3.5. Detección de genes de virulencia y de elementos genéticos móviles	93
4.3.6. Tipado molecular: Epidemiología global y caracterización de brotes. Análisis filogenómico	93
5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistente en el ambiente hospitalario. Brotes nosocomiales	97
II. Justificación y objetivos	103
Justificación	105
Objetivos	107
III. Material y métodos	109
1. Pacientes y origen de los aislados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	111
1.1. Pacientes	111
1.2. Aislados	112

2. Identificación y estudio de sensibilidad a antimicrobianos. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia a carbapenémicos	115
2.1. Identificación y estudio de sensibilidad a antimicrobianos	115
2.1.1. Método Epsilométrico	118
2.2. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia a carbapenems	119
2.2.1. Test bioquímico: β -Carbatest (BioRad)	119
2.2.2. Determinación de la inhibición de la hidrólisis de carbapenems por distintos compuestos	120
3. Caracterización genotípica de mecanismos de resistencia a carbapenems y otros β-lactámicos	121
4. Detección del fenotipo de hiper mucoviscosidad: “Test de String”	122
5. Estudios de clonalidad: análisis del patrón de macrorrestricción del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE)	123
5.1. Extracción del ADN cromosómico	123
5.2. Digestión del ADN y electroforesis en campo pulsado (PFGE)	124
5.3. Análisis del patrón de macrorrestricción del ADN cromosómico	125
6. Ensayos de transferencia horizontal de genes de resistencia	126
7. Secuenciación masiva	127
7.1. Extracción del ADN mediante métodos automatizados	128
7.2. Secuenciación masiva	128
7.3. Análisis de las secuencias obtenidas	129
7.3.1. Preprocesamiento de las lecturas	129
7.3.2. Tipado de las cepas, detección e identificación de genes de resistencia, factores de virulencia y plásmidos	131
8. Estudio epidemiológico	145
IV. Results	147
1. Isolates’ characteristics	149
2. Demographics and clinical features of patients infected and/or colonized by carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates	149
3. Antimicrobial susceptibility testing	157
4. Carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> typing: Multi-locus Sequence-typing	153
5. Carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistome	167
5.1. Phenotypic detection of carbapenemase production	167
5.1.1. β -Carbatest (BioRad)	167
5.1.2. Inhibitor-based approach for carbapenemase production detection	167
5.2. Genotypic detection of β -lactamase and carbapenemase genes by LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)	167
5.3. Genotypic detection of antimicrobial resistance genes or mechanisms applying Next-Generation Sequencing	169
5.3.1. β -lactam resistance genes	170
5.3.2. Non- β -lactam resistance genes	172
5.4. Resistome and Sequence-type comparison	176
5.5. Porin mutation detection	177
5.6. Concordance between genotype and phenotype	177
6. Carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> virulome	179
6.1. String test	179

6.2. Capsular polysaccharide (K antigen), wzj gene and capsular lipopolysaccharide (O antigen)	179
6.3. Other virulence factors	184
7. Carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> mobilome	187
7.1. Plasmid characterization	187
7.1.1. Plasmid incompatibility groups	187
7.1.2. Plasmid annotation	191
7.2. Conjugation assays	194
8. Epidemiological relationship and outbreak investigation	197
8.1. Pulse-field gel electrophoresis	197
8.2. Epidemiological relationship and outbreak investigation	200
V. Discussion	213
1. Demographics and clinical features	217
2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> population structure and resistome	219
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> virulome	225
4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> mobilome	227
5. Carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> nosocomial outbreaks	231
6. Integration of Next-Generation Sequencing into Clinical Microbiology	235
Limitations of the study	237
VI. Conclusions	239
VII. Anexos	243
VIII. Producción científica	247
IX. Bibliografía	267

ABREVIATURAS

ADN= Ácido desoxirribonucleico

ARG= Antimicrobial resistance genes

ARIBA= Antimicrobial Resistance Identification by Assembly

BAM=Archivo binario del archivo SAM

BGNNF= Bacilos gram-negativos no fermentadores

BJM= Bush-Jacoby-Medeiros

BLEE= β -lactamasas de espectro extendido

BO= Ácido fenilborónico

BWA=Burrows Wheeler Aligner

CG= Clonal groups

CHGUV= Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

CL= Cloxacilina

CLSI= Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI= Concentración mínima inhibitoria

CRKP= Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

C1G= Cefalosporinas de primera generación

C3G= Cefalosporinas de tercera generación

DNA= Deoxyribonucleic acid

DHFR= Dihidrofolato reductasa

DM= *Diabetes mellitus*

DP= Ácido dipicolínico

dNTP= deoxinucleótidos

ddNTP= dideoxinucleótidos

ECDC= European Centre for Disease Prevention and Control

ECP= Electroforesis en campo de pulso

EPC= Enterobacteria productora de carbapenemasa

EPOC= Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ESBL= Extended-spectrum β -lactamase

EUCAST= European Committee on antimicrobial susceptibility testing

FISABIO= Fundación para fomento de la investigación sanitaria y biomédica

GC= Guanina-citosina

GFF= General format feature

IRAS= Infecciones relacionada con la asistencia sanitaria

IC= Intervalo de confianza

ICU= Intensive care unit

ITU= Infección del tracto urinario

K-locus= The capsule biosynthesis locus

KPRC= *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos

LAMP= Loop-mediated isothermal amplification

LPS= Lipopolisacárido

MIC= Minimal inhibitory concentration

MDR= Multi-drug resistant

MLST= Multi-locus sequence typing

MMR= Microorganismos multirresistentes

MR= Meropenem

NCBI=National Center for Biotechnology Information

NGS= Next-generation sequencing

O-loci=The outer lipopolysaccharide biosynthesis loci

OMP= Outer membran protein

OR= Odds ratio

PCR= Polymerase chain reaction/ Reacción en cadena de la polimerasa

PDR= Pan-drug resistant

PFGE= Pulse-field gel electrophoresis

PMQR= Plasmid-mediated quinolone resistance

PUP= Proteínas de unión a la penicilina

SAM=Sequence Alignment Map

SBL= Sequencing by ligation

SBS= Sequencing by synthesis

SMRT= Single-molecule real-time sequencing

SNP= Single nucleotide polymorphism

ST= Secuenciotipo/ Sequence-type

TAC= Tomografía axial computerizada

TMP= Trimetoprim

UCI= Unidad de cuidados intensivos

UFC= Unidades formadoras de colonia

UV= Ultravioleta

VCF= Variant calling filter

VFDB= Virulence finder database

XDR= Extremely-drug resistant

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Taxonomía del género *Klebsiella*

Figura 1.2. Visión microscópica de *K. pneumoniae* tras tinción de gram

Figura 1.3. Colonias de *K. pneumoniae* crecidas en agar McConkey

Figura 1.4. Rutas de transmisión de *K. pneumoniae* a través de las superficies

Figura 1.5. Representación esquemática de los factores de virulencia de *K. pneumoniae*

Figura 1.6. Cápsula de *K. pneumoniae* y sus funciones de protección

Figura 1.7. Estructura de los lipopolisacáridos

Figura 1.8. Principales infecciones por *K. pneumoniae*

Figura 1.9. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras. 2. Bombas de expulsión. 3. Cierre de porinas. 4. Proteínas de unión a penicilinas (PUP)

Figura 1.10. Estructura general del integrón de clase I

Figura 1.11. Distribución de la resistencia a carbapenems en cepas de *K. pneumoniae* aisladas en muestras invasivas en Europa durante el año 2019

Figura 1.12. Esquema de trabajo para el análisis mediante la técnica de MLST

Figura 1.13. Las regiones de interés son amplificadas a partir de ADN genómico (doble hebra, color negro) por medio de cebadores específicos (flechas de color azul, rojo y verde) (A). Se obtienen múltiples copias de regiones amplificadas (B), y luego se añaden adaptadores para la construcción de la biblioteca (amarillo y violeta) (C). Por último, la biblioteca es purificada para eliminar ADN genómico y los dímeros de adaptadores (D)

Figura 1.14. Flujo de trabajo en el análisis bioinformático

Figura 1.15. Optimización del tratamiento para MMR

Figura 2.1. Esquema general de la metodología para el estudio y caracterización de las cepas de KPRC

Figura 2.2. Panel de microdilución en caldo NUC69 (Beckman Coulter)

Figura 2.3. Determinación de CMI por el método epsilométrico

Figura 2.4. Procedimiento para la realización del β -Carbatest (BioRad). Fuente: Insert de BioRad, versión 2015/05

Figura 2.5. A) Inhibición con meropenem+ácido fenilborónico: detección de carbapenemasas de clase A (KPC). B) Inhibición con meropenem+ácido dipicolínico: detección de carbapenemasas de clase B (metalobetalactamasas: NDM,VIM...). C) Resistencia a temocilina: detección de carbapenemasas de clase D (OXA-48) (174)

Figura 2.6. “Test de String” positivo

Figura 2.7. Sistema CHEF-DR II (BioRad)

Figura 2.8. Esquema de los principales procesos en la secuenciación masiva

Figura 2.9. Esquema del algoritmo llevado a cabo por ARIBA

Figure 3.1. Gender distribution in patients infected and/or colonized by CRKP

Figure 3.2. Age distribution of patients infected and/or colonized by CRKP

Figure 3.3. Sample distribution among the 1013 CRKP isolates

Figure 3.4. Sample distribution among the 237 CRKP isolates included in the study

Figure 3.5. Distribution of the patients colonized and/or infected by CRKP among the different Hospital Wards

Figure 3.6. Main sample types found in each hospital ward

Figure 3.7. Sample origin distribution of CRKP

Figure 3.8. Resistance rates to the three carbapenems tested throughout the years

Figure 3.9. Resistance rates of the strains isolated during 2015

Figure 3.10. Resistance rates of the strains isolated during 2016

Figure 3.11. Resistance rates of the strains isolated during 2017

Figure 3.12. Resistance rates of the strains isolated during 2018

Figure 3.13. Prevalence of different STs from 2015 to 2018

Figure 3.14. β -lactamase genes detected by isothermal PCR in the studied isolates

Figure 3.15. Capsular serotypes found in the 237 *K. pneumoniae* isolates

Figure 3.16. *wzi* genes detected in the 237 *K. pneumoniae* isolates

Figure 3.17. O antigen types found in the 237 *K. pneumoniae* isolates

Figure 3.18. Graphical annotation of an IncF-type plasmid harboring *bla*NDM-1

Figure 3.19. Graphical annotation of an IncL/M plasmid harboring *bla*OXA-48

Figure 3.20. Graphical annotation of an IncF-type plasmid

Figure 3.21. Different band patterns obtained after PFGE Ct (Control strain: ATCC 25922 *Escherichia coli*)

Figure 3.22. Dendrogram obtained with Bionumerics software, version 7.6

Figure 3.23. Dissemination of Clone A throughout the years and the different wards

Figure 3.24. Phylogenetic tree of ST101 (Clone A)

Figure 3.25. Dissemination of Clone B1 throughout the years and the different wards

Figure 3.26. Dissemination of Clone B2 throughout the years and the different wards

Figure 3.27. Phylogenetic tree of ST 11 (Clone B1 and B2)

Figure 3.28. Dissemination of Clone C1 throughout the years and the different wards

Figure 3.29. Dissemination of Clone C2 throughout the years and the different wards

Figure 3.30. Phylogenetic tree of ST307 (Clone C1 and C2)

Figure 3.31. Maximum likelihood tree reconstructed from the whole genome alignment comprising 3,579,904 nucleotide positions from which 125,247 are variable sites. Controls are represented as circles and carbapenem-resistant isolates as squares. Circles and squares are filled by ST colors. The presence of carbapenemase genes is shown outside the tree with black stars for blaOXA-48-like genes and grey stars for blaNDM-like genes.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Características bioquímicas de *K. pneumoniae*

Tabla 1.2. Grupos de β -lactamasas de espectro extendido

Tabla 1.3. Clasificación de las carbapenemasas según Ambler y Bush e hidrólisis de distintos β -lactámicos

Tabla 1.4. Características de las distintas plataformas de secuenciación

Tabla 2.1. Antimicrobianos analizados y rango de diluciones en los paneles MicroScan

Tabla 2.2. Interpretación de los resultados del β -Carbatest (BioRad) tras incubación 30 minutos a 37°C.

Tabla 2.3. Genes de resistencia detectados mediante PCR isotérmica

Table 3.1. Statistical results of risk factors associated to CRKP infection

Table 3.2. Susceptibility rates to antimicrobial agents assessed in 237 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates.

Table 3.3. Differences in susceptibility rates in clinical samples vs. surveillance cultures

Table 3.4. Allelic profiles of each *K. pneumoniae* sequence-type identified

Table 3.5. Resistance genes detected by PCR in 237 CRKP isolates

Table 3.6. *bla*TEM-family resistance genes detected

Table 3.7. *bla*SHV-family resistance genes detected

Table 3.8 *bla*CTX-M-family resistance genes detected

Table 3.9. AmpC resistance genes detected

Table 3.10. *bla*NDM-family resistance genes detected

Table 3.11. Aminoglycoside resistance genes detected

Table 3.12. Sulfonamide resistance genes detected

Table 3.13. Trimethoprim resistance genes detected

Table 3.14. Rifampicin resistance genes detected

Table 3.15. Tetracycline resistance genes detected

Table 3.16. Fluorquinolone resistance genes detected

Table 3.17. Colistin resistance genes detected

Table 3.18. Resistance patterns according to sequence-types

Table 3.19. Concordance between genotype and real phenotype

Table 3.20. Relationship between STs, K-type, *wzi* gene and O-antigen

Table 3.21. Classification of Yersiniabactin sequence-types according to strains sequence-types

Table 3.22. Plasmid incompatibility groups detected in the 237 *K. pneumoniae* isolates

Table 3.23. Most frequently observed plasmid types and resistance genes

Table 3.24. Incompatibility groups detected according to the different STs

Table 3.25. MICs of the different strains involved in conjugation assays

Table 3.26. Clones detected in 150 CRKP isolates

Tabla 8.1. Anexo recogida de datos

Resumen

Introducción: *Klebsiella pneumoniae* es un importante patógeno humano, tanto en el ambiente hospitalario como en la comunidad. Coloniza las mucosas y la piel de pacientes hospitalizados, causando sobre todo infecciones del tracto respiratorio y del tracto urinario. En personas con comorbilidades se comporta como un patógeno oportunista, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. La rápida expansión de la resistencia a antibióticos carbapenémicos en *K. pneumoniae*, considerados antimicrobianos de última línea, se atribuye a la adquisición de enzimas con capacidad para hidrolizar estos antibióticos. Además, esta diseminación se ve facilitada por la existencia de elementos genéticos móviles que pueden transferirse de forma horizontal dentro de la misma especie. Por este motivo, tras la creciente alarma por el aumento de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapems y sus preocupantes consecuencias para la salud pública decidimos realizar un estudio en nuestra área para caracterizar las cepas de *K. pneumoniae* en las que se detectara resistencia a dichos antimicrobianos. Por otro lado, con el desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación masiva y su reciente aplicación a la Microbiología Clínica, se está obteniendo información precisa sobre los genes relacionados con la resistencia antimicrobiana, así como sobre los elementos genéticos móviles en los que se encuentran dichos genes. Además, también pueden identificarse genes de virulencia y llevarse a cabo estudios epidemiológicos para la caracterización de brotes. Esta novedosa técnica se ha utilizado en esta tesis doctoral para obtener una comprensión más profunda de las características genéticas de los microorganismos estudiados, así como para realizar una comparación con los métodos “clásicos” hasta ahora disponibles en los laboratorios de Microbiología Clínica.

Objetivos: El objetivo principal ha sido caracterizar las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems aisladas durante los años 2015-2018 en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia. Como objetivos secundarios, también se ha llevado a cabo lo siguiente: Descripción de las características clínico-demográficas de los pacientes con aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems y análisis de posibles factores de riesgo relacionados con dichos

aislamientos; estudio del perfil de sensibilidad de las cepas y caracterización fenotípica y genotípica de mecanismos de resistencia antibiótica; análisis de elementos genéticos móviles relacionados con la diseminación de resistencias; determinación de factores de virulencia; análisis e investigación de brotes nosocomiales.

Metodología: Se llevó a cabo un estudio retrospectivo desde enero del año 2015 hasta diciembre del año 2018, ambos inclusive, en el Servicio de Microbiología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV), incluyendo todas las cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenems (KPRC). Se recopilaron datos clínicos y demográficos de los pacientes infectados y/o colonizados por KPRC a partir del sistema informático del laboratorio (GestLab) y de las historias clínicas electrónicas consultando el programa Hospital General Intranet. Todos los datos se registraron en una base de datos Excel para su posterior estudio y análisis estadístico. El único criterio de inclusión para el estudio fue el aislamiento de KPRC. Los datos recogidos de cada paciente fueron los siguientes: Sala de hospitalización (únicamente el episodio en el que se aísla la KPRC incluida en el estudio); hospitalización previa (< 6 meses); tipo de infección (en caso de producirse), si se considera asociada a la asistencia sanitaria (IRAS): aparición de la infección tras al menos 48 horas de hospitalización o durante los 30 días posteriores a la asistencia sanitaria; o si, por el contrario, se considera infección adquirida en la comunidad; antibioterapia reciente (< 30 días); *diabetes mellitus*; insuficiencia renal crónica; cirrosis; enfermedad pulmonar crónica; uropatología funcional o estructural; catéter urinario; colonización previa (faríngea o axilo-rectal); neumonía (asociada o no a ventilación mecánica); cirugía o complicaciones derivadas de la misma (< 30 días). Para el análisis estadístico, se realizó un análisis univariado de todas las variables: factores de riesgo para desarrollar infección y/o colonización por KPRC. Se calcularon los Odds ratio (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95% utilizando el software en línea MedCalc.

En este estudio se incluyó únicamente una cepa de KPRC por paciente, habitualmente el primer aislamiento, excepto en aquellos casos en los que dicha cepa no se encontrara disponible.

Los aislamientos de *K. pneumoniae* procedentes de muestras clínicas y/o muestras de vigilancia activa durante los años 2015 a 2018 se identificaron mediante pruebas bioquímicas con el método automatizado MicroScan® (Beckman Coulter) con los paneles NUC69 y NC70, en función del tipo de muestra (NUC69 orinas y NC70 resto de muestras). Este método combina diferentes pruebas bioquímicas y enzimáticas para la identificación de los microorganismos, junto con concentraciones críticas de antibióticos para determinar la concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$) (CMI) de los distintos antibióticos frente a los microorganismos. Para la interpretación categórica de sensibilidad antibiótica se siguieron los puntos de corte publicados por el CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*) de cada año correspondiente. En el caso de la tigeciclina, se utilizaron los puntos de corte publicados por EUCAST (*European Committee on antimicrobial susceptibility testing*) para *Escherichia coli*. En el caso de la fosfomicina, se utilizaron los puntos de corte publicados por el CLSI para *Escherichia coli*. Tras la interpretación previamente mencionada, se clasificaron los microorganismos del estudio en multirresistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) o panresistentes (PDR), según la clasificación de Magiorakos *et. al.* Por un lado, La detección fenotípica de mecanismos de resistencia a carbapenems se realizó mediante test bioquímico (β -Carbatest de BioRad). El test se realizó a todas las cepas incluidas en el estudio, en microtubos a partir de colonias frescas de *K. pneumoniae* crecidas en agar sangre. Se observó un cambio de color (de amarillo a rojo o naranja) de la solución en los casos en los que había producción de carbapenemasas. La interpretación del resultado se realizó tras 30 minutos de incubación a 37°C, según las indicaciones del fabricante. Por otro lado, también a nivel fenotípico, se llevó a cabo la determinación de la hidrólisis de carbapenems mediante el estudio de la sinergia de discos de carbapenémicos combinados con inhibidores (ROSCO Diagnostica). Se realizó una dilución 0.5 McFarland y se sembró en placas de agar Müeller-Hinton, incubándolas a 37°C durante 18-24 horas.

La caracterización de las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), β -lactamasas AmpC y carbapenemasas en los aislamientos de *K. pneumoniae* se realizó mediante la detección de los

genes que codifican dichas resistencias por PCR isotérmica en el sistema comercial Eazyplex (Amplex Biosystems GmbH, Giessen, Germany) utilizando los kits Eazyplex[®] Superbug CRE system y Eazyplex[®] AmpC. Esta prueba se realizó a todas las cepas incluidas en el estudio. Para determinar si cada aislamiento de *K. pneumoniae* se consideraba fenotipo hipermucoviscoso se realizó el “test de String” a todas las cepas incluidas en el estudio. Se llevó a cabo de la siguiente manera: con un asa de 1µl se tocó una colonia crecida en agar sangre tras 18 horas de incubación a 37°C. Posteriormente, se realizó un movimiento hacia arriba en sentido perpendicular a la placa. Se consideraron cepas con fenotipo hipermucoviscoso aquellas que levantaron un filamento (o “cuerda” del inglés “string”) de más de 5 mm de longitud. El análisis del patrón de macrorrestricción del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsado fue utilizado en esta tesis doctoral para realizar estudios de clonalidad. Hasta la fecha se ha considerado el método de referencia ya que posee un elevado poder de discriminación y una excelente reproducibilidad. Todas las cepas se tipificaron mediante PFGE-RFLP en el CHEF-DR II (Bio-Rad) utilizando una endonucleasa de baja frecuencia de corte (*Xba*I), siguiendo el protocolo descrito por Han *et. al.* La interpretación de los patrones de bandas se hizo siguiendo criterios preestablecidos por Tenover. Tras el análisis visual, se consideraron clones idénticos aquellos que presentaron las mismas bandas, clones genéticamente relacionados aquellos que presentaron una diferencia de 3 o menos bandas y clones distintos cuando la diferencia fue de más de 3 bandas. Además, la comparación de los patrones de bandas también se realizó mediante el programa informático Bionumerics v7.6 (Applied Maths). La relación se calculó mediante el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages), que utiliza medias ponderadas según el número de elementos que hay en cada conglomerado. La similitud de bandas se determinó con el coeficiente DICE, que compara la similitud de dos muestras, con un valor de optimización del 1% y una tolerancia del 1.5%. Se asignó a cada clon distinto una letra del abecedario correlativa: A, B, C... etc. Cuando se trató de subtipos genéticamente relacionados se le asignó un número a la letra correspondiente: A1, A2, etc. También se llevaron a cabo experimentos de transferencia horizontal

de material genético, adaptando el protocolo descrito por Möller *et al.* con el fin de demostrar la capacidad de diseminación de las carbapenemasas detectadas en las cepas de *K. pneumoniae*. Se seleccionaron dos cepas donantes: una productora de *bla*OXA-48 y otra productora de *bla*NDM-1. El ensayo se realizó en medio líquido, utilizando la cepa de *Escherichia coli* J53 (resistente a azida sódica) como cepa receptora. Las colonias crecidas en los medios de cultivo selectivos para el experimento (agar con ertapenem 0.5 µg/ml y azida sódica 100 µg/ml) fueron identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF, y el estudio de sensibilidad antibiótica se realizó de forma manual con discos de antibiótico (BD) de amoxicilina-clavulánico (20/10 µg), ertapenem (10 µg), meropenem (10 µg), ciprofloxacino (5µg) y gentamicina (10 µg), para comprobar que únicamente los genes de resistencia vehiculizados en plásmidos se encontraban en la cepa receptora. En el caso de haberse realizado la transferencia horizontal con éxito, únicamente deberíamos encontrar en la cepa receptora las resistencias antibióticas vehiculizadas en plásmidos (β -lactámicos principalmente y en función del plásmido también resistencia a otras familias de antibióticos como los aminoglucósidos) y no las cromosómicas (quinolonas). Posteriormente, se realizó el antibiograma completo mediante microdilución en caldo utilizando el sistema MicroScan (Beckman Coulter) para obtener las CMI de los antimicrobianos necesarios.

La secuenciación masiva de las cepas incluidas en esta tesis doctoral se realizó en el departamento de Genómica y Salud de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO). Las etapas siguientes, que comprenden tanto el procesamiento de las lecturas como su análisis bioinformático, fue trabajo de esta tesis doctoral realizado por la doctoranda durante una estancia en dicho departamento. La extracción del ADN de todos los aislados se realizó en el Servicio de Microbiología del CHGUV a partir de cultivos de 18-24 horas de incubación en Müller-Hinton Agar (BD) mediante el método automatizado MagCore Automated Nucleic Acid Extractor (RBC BioScience). Previo a la secuenciación, se realizó la comprobación de la calidad del ADN genómico, así como su cuantificación con Qubit utilizando el dsDNA HS Assay Kit (InvitrogenTM). El kit proporciona soluciones para el reactivo de ensayo

concentrado, el tampón de dilución y las seroalbúminas bovinas (DNA) prediluidas. Este método parte de 1 μ l de muestra al que se añade una mezcla de tampón de dilución y el reactivo específico para la cuantificación de ADN de doble cadena en un volumen final de 200 μ l. Una vez determinada la concentración de cada muestra, se realizaron alícuotas de 5 μ l a 0,2 ng/ μ l que se emplearon para la secuenciación. La secuenciación masiva se realizó en un sistema Illumina NExtSeq 500 utilizando kits Nextera XT, DNA library preparation kit para la preparación de la librería y el Illumina Reagent kit v3. El flujo de trabajo que se siguió comprende tres grandes bloques: preprocesamiento de las secuencias (calidad y filtrado); tipado de las cepas, detección e identificación de genes de resistencia, plásmidos y factores de virulencia; reconstrucción del genoma: ensamblaje por mapeo y ensamblaje de novo, anotación de genes y plásmidos, estudio de mutaciones en porinas. Así pues, una vez obtenidas las secuencias en crudo, se realizó un control general de los millones de lecturas que se encuentran en cada archivo fastq utilizando las herramientas FastQC y MultiQC. Esta información es la que permitió decidir qué filtros de calidad utilizar para eliminar lecturas y mantener únicamente aquellas con buena calidad. El tipado de cada cepa mediante la caracterización de secuencias de varios loci (MLST) se realizó utilizando el programa ARIBA a partir de las lecturas obtenidas de la secuenciación masiva, utilizando una función que se conoce como "MLST-calling". Para la detección de genes de resistencia a antimicrobianos presentes en cada uno de los aislados se utilizó ARIBA, que utiliza un algoritmo que agrupa las secuencias de referencia según su similitud utilizando CD-HIT v4.6. Este programa crea grupos o clusters de secuencias utilizando un umbral de similitud. En este caso agrupa todas las secuencias de la base de datos en el mismo grupo si comparten un 90% de similitud. Una vez agrupadas se ensamblan con FERMI-LITE v0.1, y la secuencia resultante se alinea y se compara mediante NUCMER v3.1 para elegir la referencia más cercana. ARIBA contiene distintas bases de datos con genes de resistencia: ARG-ANNOT, CARD, MEGARes y ResFinder, y las lecturas obtenidas a partir de la secuenciación se lanzaron contra estas cuatro bases de dato, con el fin de obtener la mayoría de los genes de resistencia presentes posible, ya que hay ligeras diferencias entre las

bases de datos. Del mismo modo, ARIBA se utilizó también para la detección de factores de virulencia, lanzándose las lecturas contra la base de datos Virulence finder database, y para la detección de plásmidos utilizando la base de datos PLASMIDFINDER. Para la reconstrucción del genoma en esta tesis doctoral se utilizaron tanto el ensamblaje por mapeo (alineamiento de las lecturas contra un genoma de referencia lo más cercano posible al genoma que se quiere reconstruir) y el ensamblaje *de novo* (busca el solapamiento entre extremos de las lecturas, alargando así las lecturas cortas). El estudio epidemiológico de las cepas que parecían estar relacionadas se llevó a cabo, por un lado, a partir de los resultados obtenidos por la electroforesis en campo de pulso, así como mediante la obtención de árboles filogenéticos a partir de los genomas ensamblados utilizando IQTREE y la herramienta iTOL para su visualización.

Resultados: Un total de 8612 aislados de *K. pneumoniae* se recogieron en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia desde enero del 2015 hasta diciembre del 2018, de los cuales 1013 resultaron resistentes a carbapenems, siendo 607 los obtenidos a partir de cultivos de vigilancia activa y 406 a partir de muestras clínicas. Se seleccionó un aislamiento por paciente (N=237). De los 237 pacientes, 150 fueron hombres y 87 mujeres, con rangos de edad entre 26-99 años, sin encontrar diferencias significativas entre hombres y mujeres. La mayoría de las muestras se obtuvieron de la Unidad de Cuidados Intensivos. Un total de 133 pacientes padecieron infección por *K. pneumoniae* resistente a carbapenems, de los cuales 58 ya estaban colonizados previamente. En cuanto a los factores de riesgo estudiados, se observó que existía riesgo estadísticamente significativo de sufrir infección por KPRC si el paciente había tenido un ingreso previo en el hospital, si había recibido antibioterapia o si había sido sometido a una cirugía previa. Además, también se observó una mayor probabilidad de infección en el caso de pacientes con *diabetes mellitus*, aquellos portadores de sonda urinaria y pacientes con enfermedad renal o pulmonar crónica.

En cuanto al estudio de sensibilidad antibiótica, tras la realización del antibiograma se observó que entre las 237 cepas de KPRC ertapenem fue el carbapenem con mayor porcentaje de resistencia (100%), seguido por meropenem e imipenem. Además, más del 90% de los aislamientos resultaron resistentes a cefalosporinas de tercera generación y quinolonas. Se observó una resistencia moderada a tigeciclina y fosfomicina y, en cuanto a los aminoglucósidos, gentamicina y tobramicina presentaron mayores porcentajes de resistencia que amikacina. En el caso de trimetoprim-sulfametoxazol se detectó resistencia en el 75% de los aislamientos, y la colistina resultó uno de los antibióticos con mayor porcentaje de cepas sensibles. Cabe mencionar que no todos los antibióticos fueron testados en todas las cepas, puesto que el panel utilizado dependió del tipo de muestra del que se aisló cada cepa de *K. pneumoniae*. La multirresistencia antibiótica de *K. pneumoniae* es un fenómeno creciente a nivel hospitalario y también fue estudiado en esta tesis: El 84% de las cepas fueron clasificadas como multirresistentes, mientras que el 16% se clasificaron como extremadamente resistentes.

El tipado de las cepas de *K. pneumoniae* incluidas en el estudio se realizó mediante MLST, detectando 22 secuenciotipos distintos. El ST307 fue el más frecuentemente detectado (N=78), seguido del ST11 (N=57) y ST101 (N=36).

El estudio del resistoma se llevó a cabo de forma fenotípica (β -Carbatest y determinación de la inhibición de la hidrólisis de carbapenems) y fenotípica (PCR y secuenciación masiva). Un total de 118 aislados resultaron ser productores de la carbapenemasa OXA-48, 109 de los cuales también fueron clasificados como productores de BLEE. Se detectó co-producción de carbapenemasas en 7 casos (OXA-48 + NDM-1). En cuanto a genes de resistencia a antimicrobianos no β -lactámicos, cabe destacar la presencia de *AadA2* en el caso de los aminoglucósidos, *sul2* en el caso de las sulfonamidas, *Dfra14* en el caso de trimetoprim y *parC*, *GyrA*, *Qnr*, *Aac-6'-Ibcr* y *OqxAB* en el caso de las quinolonas. Se detectaron mutaciones en las porinas de 191 aislados, siendo en todos los casos OmpK36 la proteína mutada. Se analizó la concordancia entre resistencia fenotípica y genotípica, obteniendo buenos resultados para la mayoría de los antimicrobianos excepto para

aminoglucósidos, tetraciclinas, imipenem y meropenem, probablemente debido a los distintos niveles de expresión de los genes de resistencia en el caso de los aminoglucósidos y las tetraciclinas, y por los distintos grados de hidrólisis en el caso de los carbapenems.

El estudio del viruloma de las cepas mostró que tan solo un aislamiento de *K. pneumoniae* presentaba el serotipo K1 y el gen *rmpA*, relacionados ambos con la hipervirulencia. Otros factores de virulencia identificados fueron yersiniabactina (N=106), colibactina (N=3), salmochelina (N=1) y aerobactina (N=8).

En esta tesis doctoral se llevó a cabo la investigación de la diversidad de plásmidos presentes en las cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenems utilizando las lecturas cortas obtenidas de la secuenciación masiva, con el fin de caracterizar los elementos genéticos móviles y su prevalencia en nuestra área, siendo el grupo de incompatibilidad IncFIB el más frecuentemente detectado (N=221), seguido de IncL (N=125). Con el fin de determinar qué plásmidos se asociaban con cada gen de resistencia a carbapenems encontrado en nuestro estudio, se llevó a cabo la anotación plasmídica a partir de las secuencias obtenidas de la secuenciación masiva. En el caso de las cepas productoras de la carbapenemasa OXA-48 se observó una fuerte asociación entre el grupo de incompatibilidad IncL/M y el gen *blaOXA-48*, no encontrándose ningún otro gen de resistencia antibiótica en el mismo plásmido. Por el contrario, en cuanto al gen de la carbapenemasa NDM-1, se encontró en distintos grupos de incompatibilidad, siendo el mayoritario IncF. Además, estos plásmidos resultaron ser portadores de otros genes de resistencia además de *blaNDM-1*: *RmtF*, *sul*, *blaDHA-1*, *blaCTX-M*, etc.

En nuestro estudio, tanto los resultados de la electroforesis en campo de pulso como la obtención de los árboles filogenéticos para la determinación de la relación epidemiológica de los aislamientos mostró que los clones más frecuentemente aislados pertenecían a los siguientes secuenciotipos: ST101 (clon A), ST11 (clones B1 y B2), ST307 (clones C1 y C2) y ST437 (clones D1 y D2). Estos cinco clones pertenecientes a cuatro secuenciotipos correspondieron al 85% de todos

los aislamientos del estudio, siendo responsables de brotes asociados a salas a lo largo de los cuatro años investigados.

En este estudio se ha llevado a cabo la caracterización molecular de 205 aislamientos de KPRC utilizando técnicas de secuenciación masiva, obteniendo así pues información sobre resistencia antibiótica, viruloma y relación epidemiológica de los aislamientos estudiados. Estos resultados muestran que las cepas de *K. pneumoniae* que circulan en nuestro área son portadoras de múltiples genes de resistencia antibiótica, así como de determinantes de virulencia, que se diseminan de forma clonal y por adquisición de plásmidos, coincidiendo con las conclusiones obtenidas en otros estudios similares. Además, también se llevó a cabo la identificación y la caracterización de los plásmidos involucrados en la resistencia antibiótica, que no hubiera sido posible utilizando las técnicas implementadas en la actualidad en los laboratorios de Microbiología. Hasta el momento, el impacto de la secuenciación masiva en la Microbiología Clínica había sido limitado. No obstante, está empezando a revolucionar el análisis epidemiológico para el control de la infección y la detección de brotes. En nuestro caso, la tecnología de secuenciación masiva ha sido una herramienta útil en la comprensión de los mecanismos de resistencia antibiótica, virulencia y la diseminación clonal de los aislamientos de KPRC.

Limitaciones: La información de los ingresos de los pacientes fue en muchos casos limitada, especialmente en aquellos pacientes ingresados en la UCI por el diferente programa informático utilizado. La información con respecto a la previa colonización de los pacientes infectados por KPRC también fue limitada, ya que el estudio de vigilancia activa solo se realiza a aquellos ingresados en la UCI. Al tratarse de un estudio retrospectivo, la recuperación de las cepas no fue satisfactoria para todas las incluidas en el estudio inicialmente. La característica de las secuencias obtenidas (secuencias cortas) no permitió cerrar completamente los plásmidos estudiados.

Conclusiones:

1. En esta tesis doctoral se combinaron tanto técnicas tradicionales implementadas en la rutina del laboratorio de Microbiología como técnicas de última generación como la secuenciación masiva, con el fin de estudiar en profundidad las cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenems que aparecieron durante los cuatro años del estudio en nuestro centro hospitalario. Las técnicas moleculares nos permitieron explorar ampliamente el resistoma, mobiloma, las variaciones genéticas dentro de la población de *K. pneumoniae* y la relación genética de los aislamientos.

2. Más de la mitad de los pacientes infectados y/o colonizados por *K. pneumoniae* resistente a carbapenems fueron mayores de 70 años, siendo la mayoría de los aislamientos de origen nosocomial. Los factores de riesgo relacionados con infección y/o colonización por KPRC que resultaron estadísticamente significativos fueron: cirugía previa o complicaciones derivadas de la misma, catéter urinario y enfermedad renal crónica.

3. La tasa de resistencias a antibióticos β -lactámicos resultó elevada, siendo todos los aislamientos resistentes a ertapenem y con sensibilidad variable a imipenem y meropenem. La co-resistencia a otros antimicrobianos no β -lactámicos fue detectada en la mayoría de las cepas del estudio: más del 90% resultaron resistentes a fluorquinolonas; alrededor del 70% a gentamicina y tobramicina y el 75% a trimetoprim-sulfametoxazol. Colistina, tigeciclina y fosfomicina fueron los antimicrobianos con mayores tasas de sensibilidad.

4. El gen *blaAmpH* se detectó en todos los aislamientos del estudio, seguido del gen *blaSHV* (97%), *blaOXA-1* (81%), *blaCTX-M* (60%) y *blaTEM* (46%). La carbapenemasa más frecuentemente detectada mediante PCR y secuenciación masiva fue OXA-48 (50%), seguida de NDM-1 (16%).

5. La diversidad de secuenciotipos y *K*-tipos, la naturaleza multi-replicon de los plásmidos detectados y la co-existencia de factores de virulencia específicos con un elevado número de genes de resistencia antibiótica sugiere la posible emergencia de una población de *K. pneumoniae* no tratable. Los genes de la porina OmpK36 del 93% de los aislamientos presentaron mutaciones, sugiriendo un posible papel sinérgico en el fenotipo de multirresistencia de estas cepas.

6. El análisis filogenético indicó que los plásmidos portadores de carbapenemasas estaban asociados de manera no aleatoria con los clones de alto riesgo, diseminándose mediante expansión clonal y propagándose frecuentemente por los centros sanitarios.

7. Los brotes simultáneos que han ocurrido durante los cuatro años del estudio (2015-2018) ponen de manifiesto la importancia de caracterizar estos aislamientos con el fin de parar su diseminación. La caracterización de las cepas de KPRC realizada en este estudio es la primera llevada a cabo mediante secuenciación masiva de nuestro área. Es, además, la primera vez que se describe la detección de *K. pneumoniae* co-productora de *bla*OXA-48, *bla*NDM-1 y *bla*CTX-M-15. Además, se detecta también por primera vez *bla*NDM-23 en tres cepas de nuestro estudio.

8. Aunque las técnicas de secuenciación masiva no pueden suplantar completamente a los métodos tradicionales de determinación de sensibilidad a los antimicrobianos, están empezando a revolucionar el futuro de la Microbiología Clínica.

I. Introducción

1. Género *Klebsiella*: *Klebsiella pneumoniae*

1.1. Perspectiva histórica y taxonomía

En 1875, el patólogo alemán Edwin Klebs descubrió la presencia de bacterias en las vías aéreas de pacientes fallecidos por neumonía (1,2). Unos años más tarde, en 1882, Carl Friedländer, un microbiólogo alemán, se percató que había bacterias en los pulmones de la mayoría de los pacientes que morían por neumonía y, por el contrario, detectó una ausencia de bacterias en los pulmones de los pacientes con otra causa de muerte. Tras este hallazgo, concluyó que dichas bacterias podrían ser la causa de la neumonía, denominándolas bacilos de Friedländer (1,3). En 1885, Trevisan dio nombre a uno de los géneros más representativos de la familia *Enterobacteriaceae* (género *Klebsiella*) y denominó al bacilo de Friedländer *Klebsiella pneumoniae*, en honor a Edwin Klebs (1,3).

La primera clasificación del género se basó en criterios clínicos, diferenciando tres especies: *K. pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* y *Klebsiella rhinoscleromatis* (4). Debido a la utilización de métodos taxonómicos moleculares, esta clasificación se ha revisado en repetidas ocasiones. La más utilizada hasta los años 2000 fue la establecida por Orskov en 1984 en la que dentro del género *Klebsiella* se incluyen 5 especies en función de sus características fenotípicas y bioquímicas: *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella ornithinolytica* y *Klebsiella planticola*.

La especie tipo del género, *K. pneumoniae*, se divide en tres subespecies: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (descrita por Schroeter en 1886), *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (descrita por Abel en 1893) y *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (descrita por Trevisan en 1887). Esta última clasificación se basa en su fenotipo, sus características bioquímicas y moleculares y en sus manifestaciones clínicas (2).

Los estudios moleculares permitieron en el año 2001 la división del género en tres clusters de acuerdo con su heterogeneidad filogenética:

- *cluster I*: incluye *Klebsiella granulomatis* y las tres subespecies de *K. pneumoniae*, consideradas las especies más patógenas
- *cluster II*: incluye *K. ornithinolytica*, *K. planticola* y *K. terrigena*
- *cluster III*: únicamente incluye *K. oxytoca* (5)

El cluster II fue reclasificado en el año 2001 como un nuevo género. El género *Raoultella*, en el que se encuentran tres especies *Raoultella ornithinolytica*, *Raoultella planticola* y *Raoultella terrigena* (4).

En la **figura 1.1** se muestra un esquema de la taxonomía del género *Klebsiella*, así como las especies dentro del género.

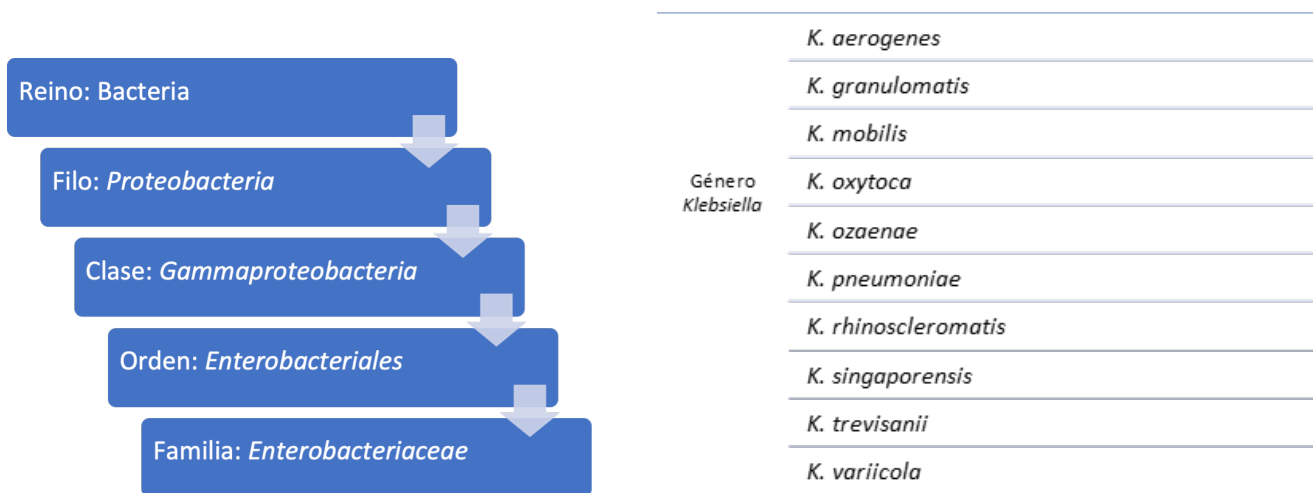


Figura 1.1. Taxonomía del género *Klebsiella*

1.2. Características microbiológicas y hábitat

Las bacterias del género *Klebsiella* son bacilos gramnegativos inmóviles, anaerobios facultativos, de tamaño entre 0.5 y 2.0 μm que forman colonias de aspecto mucoso en medios sólidos, por la formación de una cápsula de polisacáridos que determina los serotipos (ver más adelante). En la **figura 1.2** se puede observar la imagen microscópica de *K. pneumoniae* tras la tinción de gram.

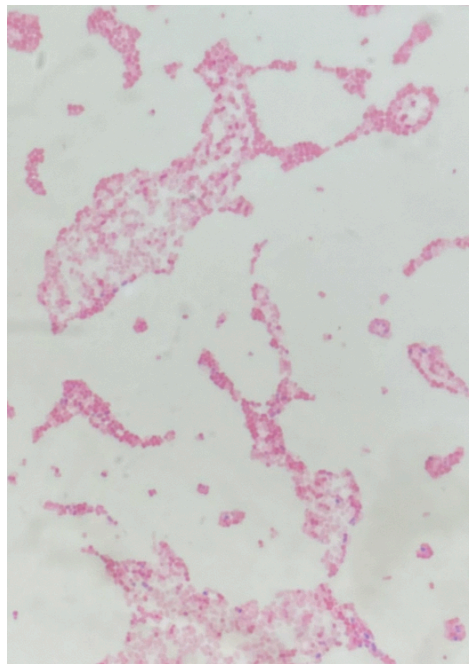


Figura 1.2. Visión microscópica de *K. pneumoniae* tras tinción de gram (6)

No tienen requerimientos específicos para su crecimiento, ya que pueden cultivarse fácilmente en medios de cultivo no enriquecidos como agar sangre, siendo las condiciones óptimas de crecimiento 37°C y pH 7. En la **figura 1.3** se pueden observar colonias de *K. pneumoniae* crecidas en agar McConkey.

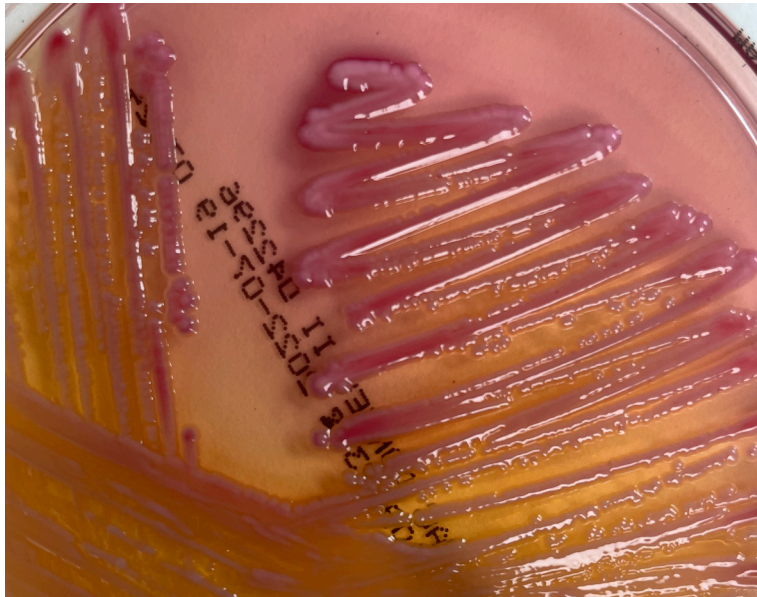


Figura 1.3. Colonias de *K. pneumoniae* crecidas en agar McConkey

Fermentan la lactosa y el manitol, y reducen el nitrato a nitrito. Tienen actividad ureasa positiva (hidroliza la urea a dióxido de carbono y amoníaco) y son indol y ornitina negativas (no degradan el triptófano y no poseen la enzima ornitina descarboxilasa), aunque siempre hay excepciones en algunas especies. No producen ácido sulfhídrico y son positivas para el test del Rojo de Metilo y Voges-Proskauer (fermentación de la glucosa por la vía ácido-mixta con producción de ácidos estables en el tiempo y por la vía butanodiólica con formación de un metabolito neutro), y para el test ONPG (presencia de la enzima β -galactosidasa capaz de fermentar la lactosa). En la **tabla 1.1** se resumen las características bioquímicas principales de *K. pneumoniae*.

Tabla 1.1. Características bioquímicas de *K. pneumoniae*

Prueba bioquímica	Resultado
Urea	+
Citrato de Simmons	+
Fermentación lactosa	+
Fermentación manitol	+
Reducción de nitratos a nitritos	+
Indol	-
Ornitina descarboxilasa	-
Rojo de metilo	+
Voges-Proskauer	+
ONPG	+
H ₂ S	-

1.2.1. Reservorio ambiental

Las bacterias del género *Klebsiella* son muy ubicuas en la naturaleza. Se pueden encontrar fácilmente en la superficie del agua, en el suelo, en plantas y en aguas residuales.

El género *Klebsiella* se considera un microorganismo nosocomial, ya que, como la mayoría de los patógenos nosocomiales más habituales, es capaz de sobrevivir en superficies inanimadas secas desde horas a varios meses, dependiendo de la naturaleza de la superficie, las condiciones de humedad y temperatura y el uso de determinados sistemas de limpieza o desinfectantes. En el ambiente hospitalario, los sistemas de distribución del agua sanitaria pueden servir como reservorios de *K. pneumoniae*, ya que sobrevive en los desagües, grifos y baños, formando parte de biocapas (7).

Los pacientes colonizados o infectados son la fuente principal de contaminación de las superficies. A partir de un paciente colonizado, las superficies cercanas se colonizan (sobre todo las que se pueden tocar fácilmente con las manos) y también pueden contaminar las manos del

personal y los dispositivos móviles (glucómetros, fonendoscopios, termómetros, etc.) y de esta forma transmitir al microorganismo a otros pacientes. La **figura 1.4** muestra las posibles rutas de transmisión de *Klebsiella* spp a través de superficies (8).

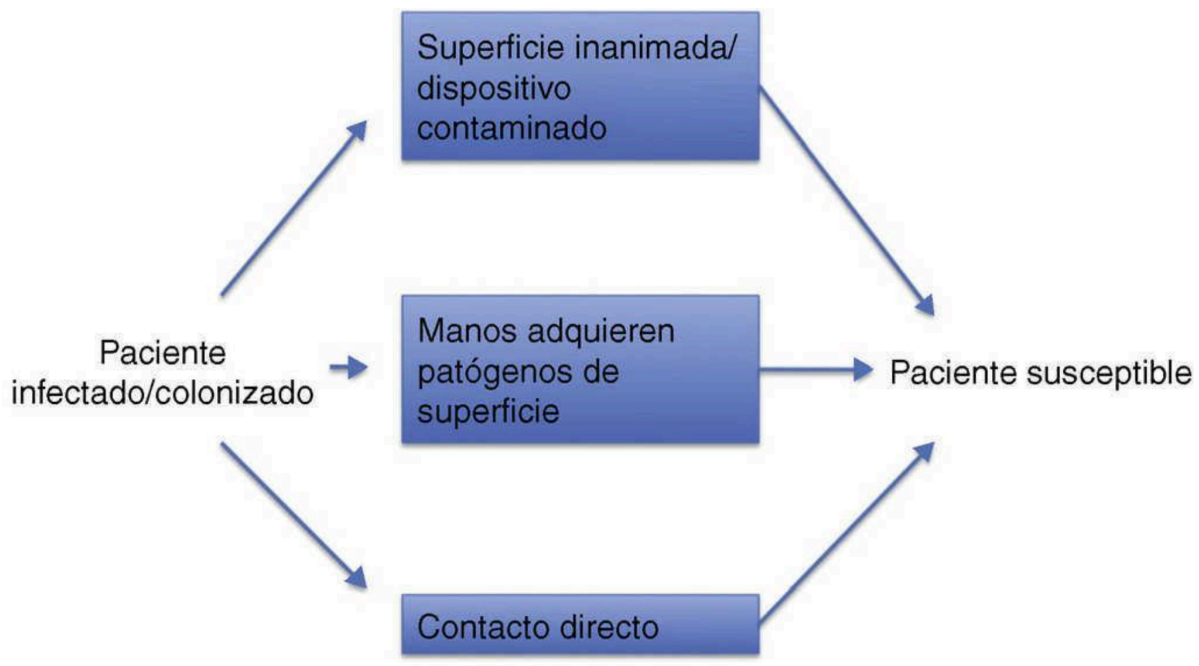


Figura 1.4. Rutas de transmisión de *K. pneumoniae* a través de las superficies

1.2.2. Reservorio humano

En humanos, *Klebsiella* spp. se presenta como saprófito en nasofaringe y en tracto intestinal. La detección de este microorganismo en las heces humanas varía entre el 5 y el 38%, mientras que la colonización nasofaríngea se encuentra entre el 1 y el 6% (9). Aunque ocasionalmente también puede colonizar la piel, no puede considerarse un miembro de la flora saprófita cutánea (10).

Klebsiella spp. suele ser un componente habitual del ambiente hospitalario, donde la tasa de pacientes colonizados se multiplica, llegando hasta el 77% en heces (11,12), de forma directamente proporcional al tiempo de estancia y sobre todo al uso previo de antimicrobianos (13). En niños, el porcentaje de portadores fecales de *K. pneumoniae* puede alcanzar hasta el 90% sin necesidad de terapia antibiótica (14).

El principal reservorio hospitalario es el tracto gastrointestinal de los pacientes colonizados, desde donde se disemina con facilidad, siendo especialmente importante su capacidad para producir brotes nosocomiales (15,16).

Los factores de riesgo que favorecen la colonización son la inmunodepresión de los pacientes con *diabetes mellitus* (DM) o cáncer, la edad en los extremos de la vida (niños y ancianos mayoritariamente), la realización de procedimientos invasivos (catéteres), el uso de agentes antimicrobianos, el alcoholismo crónico y la vulnerabilidad frente a microorganismos multirresistentes (17,18).

1.3. Factores de virulencia en *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae utiliza distintas estrategias para crecer y protegerse de la respuesta inmunitaria del hospedador. Existen cuatro clases de factores de virulencia que se han caracterizado en *K. pneumoniae*: la cápsula, incluyendo la producción de hipercápsula en cepas hipervirulentas; el lipopolisacárido (LPS); los sideróforos y las fimbrias, también conocidas como pili. También produce colibactina, genotoxina que induce daño celular en las células del hospedador. Otros factores de virulencia que se han identificado recientemente en *K. pneumoniae* incluyen porinas, bombas de expulsión de fármacos, sistemas de transporte del hierro y genes involucrados en el metabolismo de la alantoína (19,20). En la **figura 1.5** se muestran de forma esquemática los distintos factores de virulencia de *K. pneumoniae*.

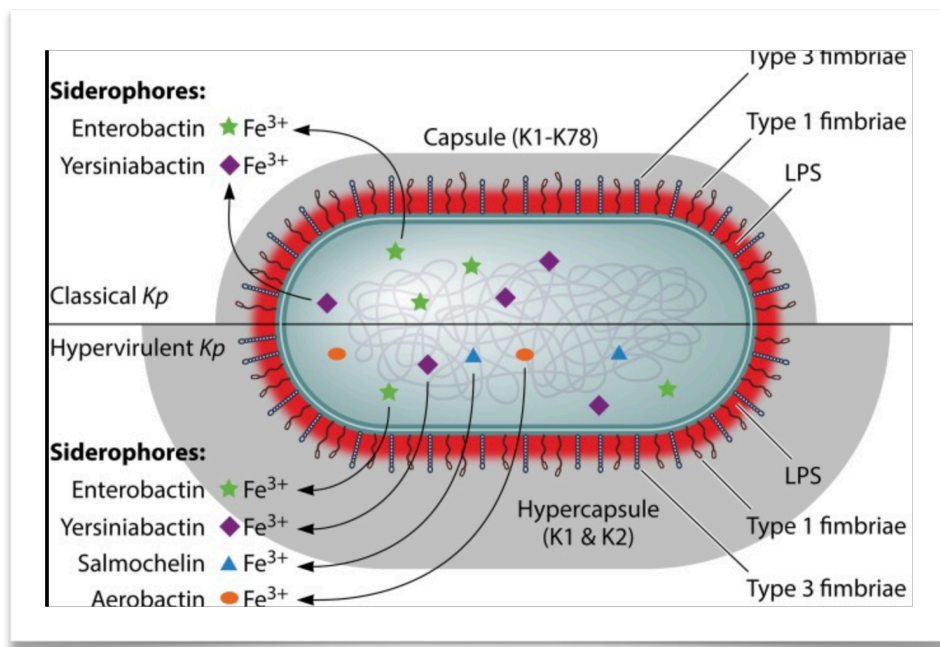


Figura 1.5. Representación esquemática de los factores de virulencia de *K. pneumoniae* (20)

a) Cápsula

Los miembros del género *Klebsiella* expresan en su superficie un polisacárido capsular conocido como antígeno K (21). Es uno de los factores de virulencia más importantes, ya que protege a *K. pneumoniae* contra la actividad bactericida del suero, los pépticos antimicrobianos y la fagocitosis (22).

Está compuesta por una matriz de polisacáridos que recubre la célula, necesaria para la virulencia de *K. pneumoniae*. Se ha comprobado que las cepas de *K. pneumoniae* que no poseen cápsula presentan un comportamiento menos virulento que las encapsuladas (23).

La secuenciación del gen *wzi* es un método rápido para predecir el serotipo. El gen *wzi* forma parte del operón capsular y está conservado en todos los tipos capsulares de *K. pneumoniae*.

Las cepas clásicas de *K. pneumoniae* producen cápsulas que pueden pertenecer a distintos serotipos entre K1 hasta K78. Entre ellos, K1 y K2 están asociados con un incremento de la patogenicidad. Además, las cepas hipervirulentas producen la llamada hipercápsula, que amplifica la producción del material capsular, consiguiendo así una cápsula más grande y un fenotipo hipermucoviscoso. Estas cepas suelen presentar el serotipo K1.

Dicho fenotipo hipermucoviscoso es la consecuencia de la expresión de dos genes: *magA* (asociado a la mucoviscosidad) y *ropa* (gen regulador del genotipo mucoide). El genotipo hipermucoviscoso se puede observar a simple vista realizando el test conocido como “String test” (25). En la **figura 1.6** se representa la cápsula de *K. pneumoniae* y las distintas funciones de protección asociadas.

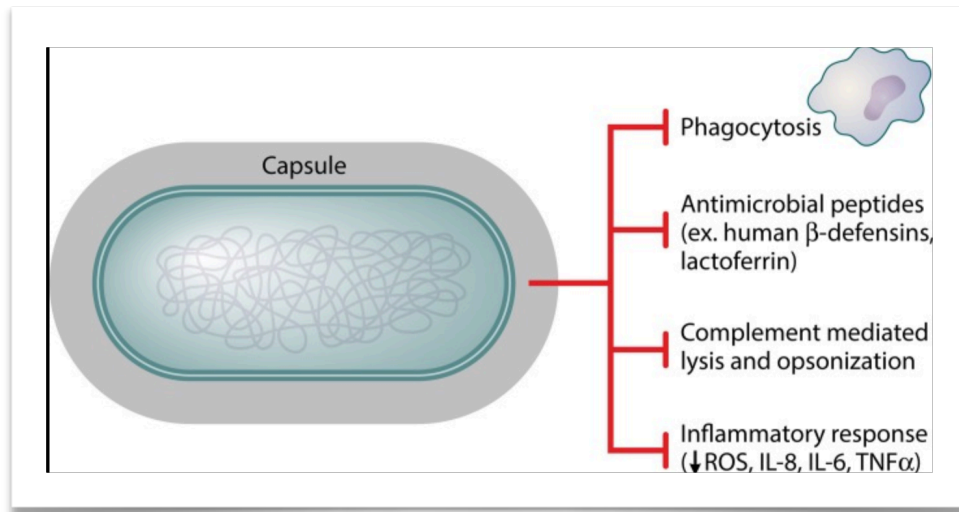


Figura 1.6. Cápsula de *K. pneumoniae* y sus funciones de protección (20)

b) Lipopolisacárido

Los lipopolisacáridos de la membrana externa son necesarios para la estructura y la inmunidad: protegen a la bacteria de los antibióticos y favorecen la adhesión. El LPS está formado por el lípido A, un núcleo de oligosacáridos y el antígeno O. La **figura 1.7** muestra la estructura de los lipopolisacáridos de la membrana externa.

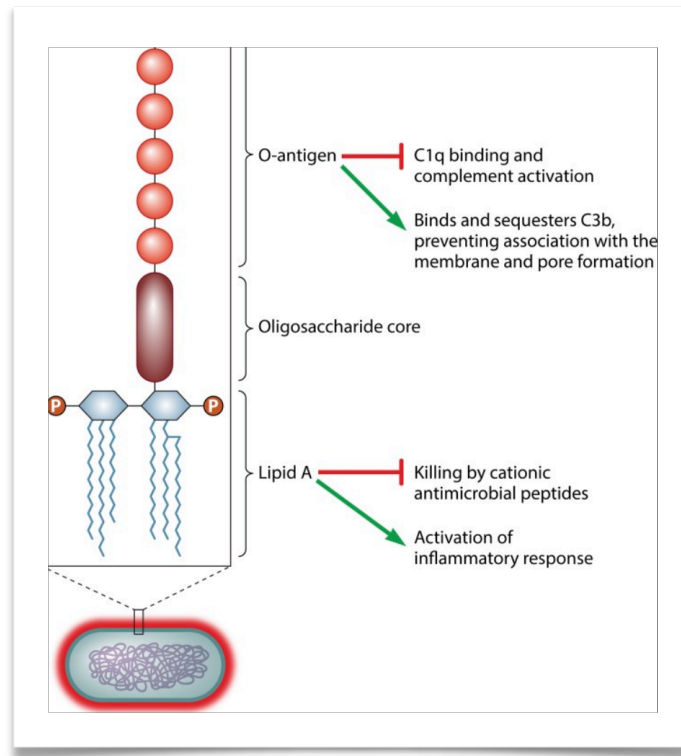


Figura 1.7. Estructura de los lipopolisacáridos (20)

El lípido A es el anclaje hidrofóbico a la membrana celular, compuesto por un disacárido de dos unidades de glucosamina, esterificado con ácidos grasos involucrados en la resistencia a los péptidos antimicrobianos (26). Constituye la endotoxina bacteriana.

El núcleo hidrofílico formado por varios azúcares facilita el sitio de unión al antígeno O, también hidrofílico, que se encuentra expuesto en la superficie bacteriana. Es el principal factor de resistencia al complemento y de defensa frente a la fagocitosis (27).

Los azúcares que componen el antígeno O, su secuencia y la forma de unirse van a determinar la especificidad del serotipo O de las diferentes cepas. Únicamente se han descrito 9 antígenos O, incluyendo los serotipos O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 y O12 (28).

En el caso de *K. pneumoniae*, el antígeno O1 es el más prevalente y está formado por unidades D-galactano I y D-galactano II repetidas, y tiene un papel determinante en la integridad y la permeabilidad de la membrana externa, así como en el transporte de moléculas a través de la

membrana. En cuanto a la patogénesis, desempeña un papel importante en la interacción de la bacteria con el sistema inmunitario (29).

c) Sideróforos

El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de especies bacterianas. De hecho, para poder crecer en los tejidos del huésped, la bacteria debe obtener hierro a partir de las proteínas transportadoras del mismo (30). Los sideróforos son, pues, sistemas enzimáticos de alta eficacia para fijar hierro en competencia con la lactoferrina o transferrina del huésped.

Algunos sideróforos son: la enterobactina (*ent*), la aerobactina (*iucA*), la yersiniabactina (*ybtS*) u otros sideróforos como el codificado por *iutA* y el sistema de adquisición de hierro *kfu* (31).

d) Fimbrias

Para la adhesión a las células del hospedador, *K. pneumoniae* presenta fimbrias que son principalmente de dos tipos: tipo 1 (manosa sensible) y tipo 3 (manosa resistente).

Las fimbrias de tipo 1 son más gruesas que las de tipo 3 (de 5 a 7 nm de diámetro), rígidas, y su propiedad adhesiva está mediada por la adhesina *fimH*, localizada en el final de las fimbrias. Estas fimbrias tipo 1 están asociadas con las infecciones del tracto urinario y respiratorio, adhiriéndose a las células tubulares proximales y a las células ciliadas de la tráquea favoreciendo la colonización (22).

Las fimbrias de tipo 3 son más delgadas (de 2 a 5 nm de diámetro) y con una longitud de 0,5 a 2 μm . Favorecen la adhesión a la superficie del hígado, pulmones y vejiga. Presentan una composición aminoacídica y una morfología, serología y composición química diferente de las fimbrias de tipo 1. El operón *mrk* codifica una adhesina de tipo fimbria tipo 3 y facilita la unión a la matriz extracelular. Está compuesto por seis genes requeridos para la expresión de las fimbrias de tipo 3: *mrkA* codifica la subunidad mayor de la fimbria; *mrkB*, *mrkC* y *mrkE* se encargan del

ensamblaje de la fimbria y la regulación de su expresión; *mrkD* codifica la adhesina responsable de la hemaglutinación y resistencia a manosa y, por último, *mrkF* mantiene la estabilidad de la fimbria en la superficie celular (32).

1.4. Importancia clínica de *Klebsiella pneumoniae*

Desde el punto de vista clínico, la importancia de *K. pneumoniae* radica en el papel que tiene como patógeno humano. Clásicamente se asoció con la neumonía de Friedländer, relacionada con el alcoholismo y con hallazgos radiológicos característicos (33,34). Sin embargo, es por su comportamiento como patógeno oportunista por lo que este microorganismo se ha convertido en uno de los protagonistas indiscutibles dentro de las infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (35,36).

K. pneumoniae causa una gran variedad de infecciones, siendo importante como patógeno respiratorio, abdominal y urinario (**figura 1.8**) (22).

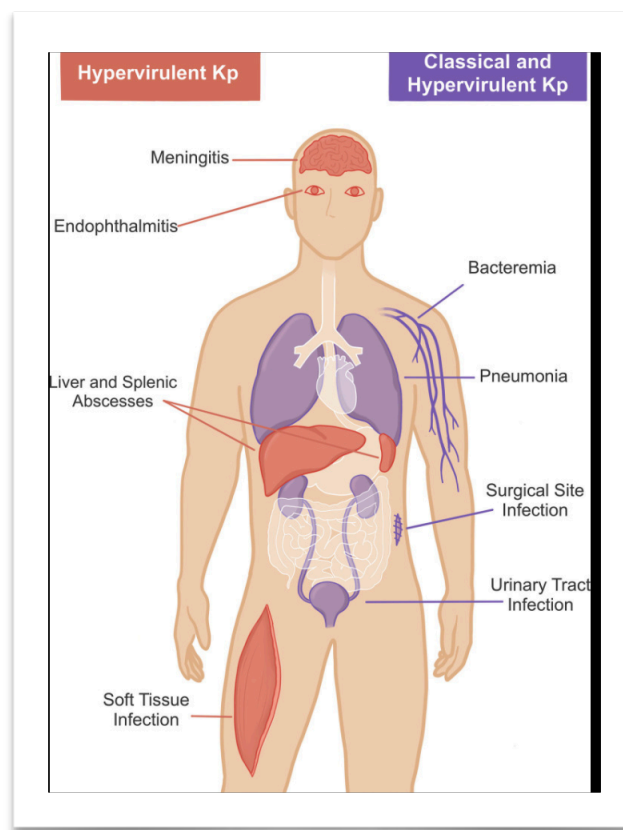


Figura 1.8. Principales infecciones por *K. pneumoniae* (37)

a) Neumonía nosocomial

K. pneumoniae es un agente causal relativamente frecuente de neumonía nosocomial, llegando a ser responsable del 7% de los casos en España (38), que coincide con la prevalencia de algunos estudios internacionales (39).

Las manifestaciones clínicas de las neumonías por *K. pneumoniae* son similares a las presentaciones típicas de neumonía nosocomial o asociada a ventilación mecánica en general, que cursa con fiebre, tos, aumento de secreciones y leucocitosis (40,41).

b) Neumonía comunitaria

Actualmente se considera que *Klebsiella* spp. producen entre el 1 y el 5% de las neumonías adquiridas en la comunidad (36), aunque son más frecuentes en determinados países como Taiwán o Sudáfrica (42). Este cuadro se relaciona fundamentalmente con dos factores de riesgo: alcoholismo y DM (33,43). Aunque puede ser inespecífica, en su presentación clásica la infección es unilateral en 2/3 de las ocasiones y afecta mayoritariamente al segmento posterior del lóbulo superior derecho, con abombamiento de cisura y frecuente evolución hacia absceso pulmonar y/o empiema (44). Desde un punto de vista clínico suele ser una enfermedad grave, frecuentemente con bacteriemia concomitante y asociada a mal pronóstico (45).

Otras infecciones pulmonares relacionadas con *K. pneumoniae* son las infecciones secundarias en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), empiema y absceso pulmonar.

c) Absceso hepático

K. pneumoniae se ha descrito también como agente causal de abscesos hepáticos primarios, suponiendo entre el 50-88% de los casos en pacientes asiáticos durante las últimas décadas.

Se han descrito casos frecuentes de abscesos hepáticos por *Klebsiella* spp. en Europa (46), Estados Unidos (47) y Asia (48) en los últimos años. Las cepas de *K. pneumoniae* causantes de este cuadro clínico se asocian con hipervirulencia, presentado serotipo capsular K1 o K2 (49). Estos cuadros son primarios, siendo causa de diseminación a otros órganos hasta en el 45% de los casos (50). Entre las complicaciones cabe destacar infecciones metastásicas : endoftalmítis, meningitis, absceso cerebral, etc. (51). Suele ser más frecuente en hombres de mediana edad con DM, considerándose el principal factor de riesgo. La forma de presentación y las alteraciones analíticas son inespecíficas. Más específica es la radiología, con nivel hidroaéreo hepático o gas en vena porta en radiografía simple de abdomen, e infiltrado alveolar pulmonar junto con derrame pleural en radiología simple de tórax. En las imágenes de TAC, los abscesos suelen ser unilobares, multiloculados y con presencia de gas (48). En cuanto al pronóstico, es mejor que en el caso de los abscesos producidos por otros microorganismos, tanto en términos de mortalidad como de riesgo de recidiva (52).

d) Infección del tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario (ITU) por *K. pneumoniae* son las infecciones más frecuentes causadas por este patógeno, suponiendo un 6% de las ITU no complicadas y un 8% de las ITU complicadas, y presentando todavía una mayor prevalencia en grupos de riesgo específicos (pacientes con DM y/o vejiga neurógena) (53).

K. pneumoniae puede producir infecciones del tracto urinario tanto inferior como superior. Las manifestaciones clínicas de las ITU causadas por *K. pneumoniae* son similares a las causadas por otros patógenos, incluyendo disuria, hematuria y un aumento de la frecuencia y la urgencia miccional (19,22).

e) Bacteriemia

En cuanto a las bacteriemias por *Klebsiella* spp., en 1985 se publicó una larga serie española de bacteriemias por *Klebsiella* spp. donde se establecía que aproximadamente el 6,6% de todas las

bacteriemias eran producidas por este género, con una incidencia de 2,3 casos/1000 hospitalizaciones (54). Los principales focos de infección en este estudio fueron: urinario, respiratorio y biliar. Concluyeron que la mortalidad era del 25% y el principal factor de riesgo era la DM (55). Actualmente la bacteriemia por *Klebsiella* spp. es de origen comunitario en el 36% de los casos y el factor de riesgo principal continúa siendo la DM. Los focos infecciosos subyacentes son los clásicos, incluyendo tracto urinario, tracto gastrointestinal, catéteres intravenosos o urinarios y tracto respiratorio. La mortalidad se sitúa entorno al 20-30% (56).

f) Otras infecciones

K. pneumoniae es un agente causal relativamente común de meningitis nosocomial, siendo la neurocirugía el principal factor de riesgo. No obstante, se considera infrecuente su participación en las meningitis adquiridas en la comunidad, salvo en el caso de las complicaciones de los abscesos hepáticos primarios.

Por otro lado, la endoftalmitis causada por *K. pneumoniae* se trata de una infección infrecuente pero devastadora, descrita en su mayoría también en asociación con abscesos hepáticos primarios en países como Taiwán y EE.UU, causada por cepas de *K. pneumoniae* pertenecientes a los serotipos K1/K2. La infección cursa con dolor ocular, visión borrosa y enrojecimiento ocular, de forma unilateral más frecuentemente que bilateral. La infección tiende a ser fulminante y rápidamente progresa hacia la pérdida permanente de la visión (57).

2. Resistencia a antimicrobianos en *Klebsiella pneumoniae*

2.1. Mecanismos generales de resistencia antibiótica

Los principales mecanismos de resistencia en bacterias Gram negativas pueden resumirse en cuatro categorías (**figura 1.9**):

1. Modificación enzimática del antibiótico
2. Bombas de expulsión
3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa
4. Alteraciones del lugar de acción

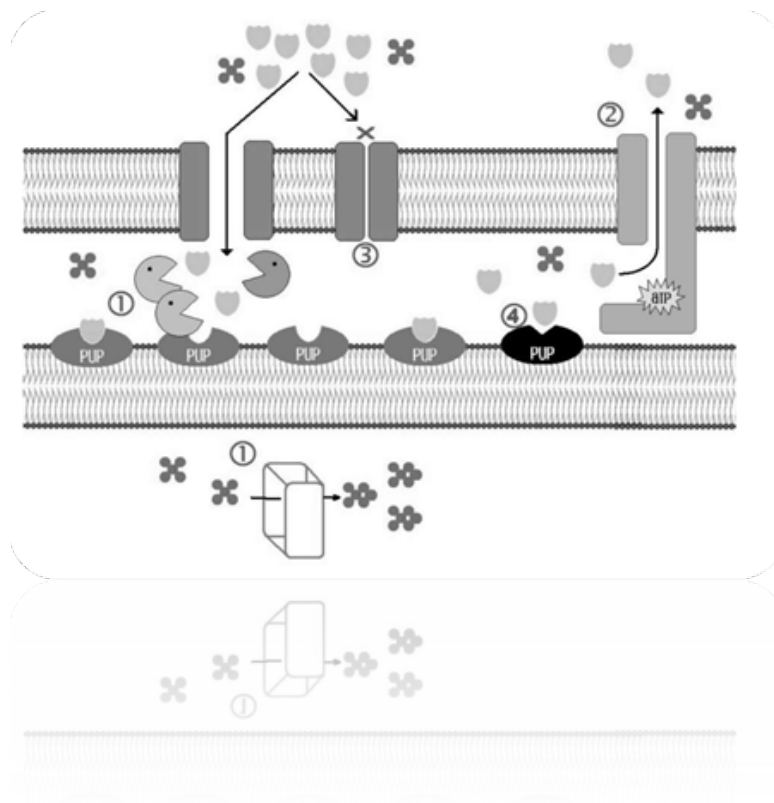


Figura 1.9. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras. 2. Bombas de expulsión. 3. Cierre de porinas. 4. Proteínas de unión a penicilinas (PUP) (58)

1. **Modificación enzimática del antibiótico:** Las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico, consiguiendo que éste pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son las más prevalentes, y son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia. De igual manera, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificarlos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación.
2. **Bombas de expulsión:** Los sistemas de expulsión están formados por proteínas de membrana especializadas, que captan y expulsan los antibióticos desde el citoplasma a la membrana de forma activa, gracias a la energía de protones o por un sistema relacionado con el ATP. Las bombas de expulsión activa AcrAB y OqxAB se han detectado frecuentemente en *K. pneumoniae*.
3. **Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** La membrana externa de las bacterias Gram negativas supone para los antibióticos β -lactámicos una barrera que atravesar antes de unirse a las PUPs, que se encuentran en la membrana citoplasmática de las bacterias. Al tratarse de antibióticos hidrófilos, los β -lactámicos no difunden bien a través de la membrana externa y deben utilizar canales proteicos inespecíficos para atravesarla, que reciben el nombre de porinas. La resistencia a antibióticos β -lactámicos puede producirse por pérdida de las porinas, por reducción de su número o por modificación de las mismas. Frecuentemente este mecanismo se asocia a otros mecanismos de resistencia, aumentando así la resistencia a los antibióticos β -lactámicos. En *K. pneumoniae* se han identificado dos porinas principales relacionadas con la entrada de carbapenémicos: OmpK35 y OmpK36 (59).
4. **Alteraciones en las proteínas de unión a la penicilina (PUP):** Las PUPs son enzimas que catalizan la síntesis del peptidoglicano y, son a su vez, la diana específica de los β -lactámicos.

Las modificaciones en su estructura impiden su interacción normal con el antibiótico, confiriendo una pérdida de afinidad por los antibióticos β -lactámicos. Consecuentemente, esto hace que las bacterias se hagan más resistentes a esta familia de antibióticos. La hiperproducción de PUPs también puede dar lugar a una disminución de la sensibilidad de la bacteria a los antibióticos β -lactámicos, al no existir suficientes moléculas del antibiótico para saturar el exceso de PUPs producidas. Este mecanismo de acción, aunque está presente en bacterias Gram negativas, es más característico de bacterias Gram positivas (58).

2.2. Resistencia a antimicrobianos β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos, cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica. Se trata de antibióticos de acción bactericida lenta, con actividad dependiente del tiempo, que en general tienen buena distribución y escasa toxicidad (60). La presencia del anillo β -lactámico define químicamente a esta familia de antibióticos. Además de su mecanismo de acción, este anillo determina la escasa toxicidad directa y el principal mecanismo de resistencia de esta gran familia de antibióticos.

Entre los diferentes grupos de antibióticos β -lactámicos se encuentran: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de β -lactamasas.

Por lo general, el espectro de los β -lactámicos incluye bacterias grampositivas, gramnegativas y espiroquetas. No son antimicrobianos activos sobre los micoplasmas (pues éstos carecen de pared celular), ni sobre bacterias intracelulares. El mecanismo de resistencia adaptativo más importante frente a los β -lactámicos es la producción de β -lactamasas por parte de algunos microorganismos. Estas enzimas hidrolizan el anillo β -lactámico, impidiendo así que el antibiótico pueda ejercer su acción (61). Actualmente existen β -lactamasas, β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas, con distintas capacidades de hidrólisis que se explican a continuación.

a) β -lactamasas

La gran diversidad de enzimas y de perfiles de hidrólisis que presentan las β -lactamasas ha hecho que se hayan propuesto distintos esquemas para su clasificación. Las clasificaciones de β -lactamasas más utilizadas son la molecular de Ambler y la funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (BJM) (62,63).

Ambler propuso en 1980 la primera clasificación de β -lactamasas basada en la estructura molecular, dividiéndolas en dos clases: clase A o penicilinasas que poseen un residuo de serina en el centro activo y clase B o metalo- β -lactamasas que requieren zinc como cofactor (82). Un año más tarde, fueron Jaurin y Grundström los que ampliaron esta clasificación con la clase C; cefalosporinasas con una serina en su centro activo (64).

A finales de los años 80, se definen como clase D las β -lactamasas tipo serina, que hidrolizan la cloxacilina o la oxacilina. Las β -lactamasas de la clase molecular D también se denominan oxacilinasas, pues hidrolizan oxacilina con mayor rapidez que las penicilinas y/o cefalosporinas. En cuanto a la clasificación propuesta por BJM, se reconocen cuatro clases mayores de β -lactamasas, una de las cuales, el grupo 2, se subdivide a su vez en 2 subgrupos en función de su perfil de hidrólisis: 2de, que hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido y 2df, capaces de hidrolizar carbapanems (65,66).

b) β -lactamasas de espectro extendido

Las BLEE son enzimas que fenotípicamente se caracterizan por conferir resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluyendo las de tercera y cuarta generación. Pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de β -lactamasas como el tazobactam y el sulbactam (67).

Las BLEE se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual permite la diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre distintas cepas de la misma especie sino también entre distintas especies bacterianas. Además de su codificación plasmídica, las BLEE forman parte frecuentemente de transposones o integrones lo cual determina su asociación con

otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que confieren resistencia a los aminoglucósidos o al cotrimoxazol.

Las cepas que producen BLEE, en su mayoría enterobacterias, son resistentes a todos los antibióticos β -lactámicos con la excepción de los carbapenems, las cefamicinas y las combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas. Además de las BLEE clásicas, de naturaleza plasmídica, existe una serie de microorganismos que producen β -lactamasas cromosómicas que, en el caso de una hiperproducción, confieren fenotipos de resistencia similares al que determinan las BLEE, esto es, resistencia a las cefalosporinas de espectro extendido e inhibición por el ácido clavulánico. Entre las enterobacterias que producen de forma natural este tipo de β -lactamasas se encuentran *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus* y distintas especies del género *Kluyvera*. De hecho, en los últimos años, como se comentará posteriormente, están adquiriendo gran relevancia un nuevo tipo de BLEE plasmídicas, denominadas CTX-M que, precisamente, derivan de la β -lactamasa cromosómica de distintas especies del género *Kluyvera*.

En los últimos años estamos asistiendo a una serie de cambios en la epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEE. Mientras que en los años 80 y principios de los 90 la mayoría de las BLEE eran del tipo TEM o SHV, actualmente las más frecuentes en la mayoría de los países, incluyendo España, son las CTX-M. En la **tabla 1.2** se describen los distintos grupos de β -lactamasas de espectro extendido.

Tabla 1.2. Grupos de β -lactamasas de espectro extendido

BLEE	País de origen	Especies en las que se detectaron inicialmente
TEM	Francia	<i>Enterobacteriaceae</i>
SHV	Alemania	<i>P. aeruginosa</i> / BGNNF
CTX-M	Alemania/Argentina	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> spp.
OXA	Turquía/Francia	<i>P. aeruginosa</i>
PER	Francia	<i>P. aeruginosa</i>
VEB	Vietnam/Tailandia	<i>E. coli</i>
GES	Guayana	<i>K. pneumoniae</i> / <i>P. aeruginosa</i>
BES	Brasil	<i>S. marcescens</i>
SFO	Japón	<i>E. cloacae</i>

c) AmpCs plasmídicas

Las AmpC son serin- β -lactamasas pertenecientes al grupo 1 de la clasificación de BJM, presentes de forma natural en el cromosoma de diversas enterobacterias y en bacilos gramnegativos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*. Por otra parte, las AmpC no son inhibidas por los clásicos inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam)(68), aunque algunas pueden ser inhibidas por sulbactam o tazobactam si la producción ocurre a bajos niveles (69,70).

Una característica de las enzimas AmpC es que no tienen efecto sobre cefalosporinas de 4ª generación ni sobre carbapenémicos, convirtiéndose así ambos en el tratamiento de elección en cepas productoras de AmpC (71,72). Cabe mencionar que las AmpC no son inhibidas por los clásicos inhibidores de β -lactamasas pero sí por sustancias como cloxacilina o ácido borónico (73), que se utilizan para su detección fenotípica haciendo uso de la lectura interpretada del antibiograma, pero no se utilizan estas sustancias como tratamiento.

d) Carbapenemasas

Las carbapenemasas son β -lactamasas con capacidad para hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenems. Estas enzimas pueden clasificarse según dos criterios diferentes (73):

1. Funcional: Descrita inicialmente por Bush en 1989 (74) y revisada por Bush, Jacoby y Medeiros posteriormente (63). Esta clasificación está basada en la capacidad de las distintas β -lactamasas para hidrolizar determinados grupos de antimicrobianos y/o su sensibilidad a la acción de los inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam).
2. Estructural: Acorde a su secuencia proteica, Ambler clasificó a las β -lactamasas en 4 clases principales: A, B, C y D (**Tabla 1.3**) (62). Las pertenecientes a las clases A, C y D precisan serina en su sitio activo, mientras que las pertenecientes al grupo B, conocidas como metalo- β -lactamasas (MBL), necesitan zinc como cofactor para realizar su actividad catalítica.

En la **tabla 1.3** aparece la clasificación de las carbapenemasas según Ambler y Bush, así como los antimicrobianos β -lactámicos que hidrolizan.

Tabla 1.3. Clasificación de las carbapenemasas según Ambler y Bush e hidrólisis de distintos β -lactámicos

Clase Molecular	Grupo funcional	Enzima	Hidrólisis				
			Penicilinas	C1G	C3G	Aztreonam	Carbapenems
A	2f	NMC	+	+	+	+	+
		IMI	+	+	+	+	+
		SME	+	+	+/-	+	+
		KPC	+	+	+	+	+
		GES	+	+	+	-	+/-
B1	3	IMP	+	+	+	-	+
		VIM	+	+	+	-	+
		GIM	+	+	+	-	+
		SPM	+	+	+	-	+
D	2d	OXA	+	+	+/-	-	+/-

C1G= Cefalosporinas de primera generación; C3G= Cefalosporinas tercera generación.

2.3. Resistencia a antimicrobianos no β -lactámicos

a) Aminoglucósidos

La acción de un aminoglucósido frente a una enterobacteria depende de varios factores, como la difusión pasiva a través de la membrana externa, el transporte activo a través de la membrana interna y la afinidad del aminoglucósido por su diana.

La resistencia a aminoglucósidos en *K. pneumoniae* se debe, por un lado, a modificaciones de la permeabilidad celular (cambios en las bombas de expulsión KpnEF y AcrAB-TolC). La delección de AcrAB-TolC aumenta la sensibilidad de tobramicina y gentamicina, mientras que las cepas mutantes de KpnEF muestran resistencia significativa a tobramicina y espectinomicina.

Otro mecanismo importante de resistencia a aminoglucósidos son las enzimas modificantes, que se pueden encontrar en diferentes combinaciones en algunas cepas:

1. Las acetiltransferasas (AAC) que acetilan un grupo amino del antibiótico
2. Las fosfotransferasas (APH) que fosforilan un grupo hidroxilo
3. Las nucleotidiltransferasas (ANT) que adenilan también un grupo hidroxilo (75).

Por otro lado, las metiltransferasas que modifican la diana (*ArmA*, *Rmt* o *Npm*) también se caracterizan por conferir un elevado nivel de resistencia a prácticamente todos los aminoglucósidos disponibles en la práctica clínica. La problemática aparece cuando se detectan genes de resistencia a carbapenems y genes de resistencia a aminoglucósidos en el mismo elemento genético móvil (plásmidos). Recientemente, las metiltransferasas se han encontrado en asociación con la carbapenemasa NDM-1 (76).

b) Fluorquinolonas

Los principales mecanismos de resistencia descritos son, por un lado, consecuencia de mutaciones en los genes de la ADN girasa (*gyrA*) y las topoisomerasas IV, dos enzimas clave para la realización, transcripción y reparación del ADN de la célula bacteriana, así como la presencia de bombas de expulsión que expulsan el antimicrobiano hacia su exterior (77). Además, en los últimos años se describen con mayor frecuencia resistencias mediadas por plásmidos (PMQR, del inglés Plasmid-mediated Quinolone Resistance) (76). Los genes implicados son los siguientes:

1. Los genes *qnr*, que codifican proteínas que protegen la ADN girasa o la topoisomerasa IV contra el efecto inhibitorio de las quinolonas.
2. Una variante del gen *aac* (6'), el *aac* (6')-Ib-cr, capaz de acetilar ciprofloxacina y norfloxacina, además de amikacina, tobramicina y kanamicina.
3. Los genes *oqxAB* y *qepA*, que codifican bombas de expulsión activa.

c) Polimixinas

A nivel cromosómico, el mecanismo principal de resistencia a polimixinas en *K. pneumoniae* es la modificación de la diana, que en este caso es el LPS. Esta modificación se produce por mutaciones en los genes responsables de la formación del lípido A (*lpxM* y su regulador *ramA*) y por su neutralización. Otros genes involucrados en la modificación del LPS llevan a cabo la adición de amino arabinosa (*pbpP*, *pmrE*), fosfoetanolamina (*pmrC*) o palmitato (*pagP*).

El aumento de genes reguladores de la modificación del LPS como *phoPQ*, *pmrA* y *pmrD* también están relacionados con la resistencia a estos antibióticos. Las mutaciones en cualquiera de estos genes reguladores conllevan la sobreexpresión de *pmrB*, o la desactivación de *mgrB*, siendo suficiente para causar resistencia a las polimixinas (78).

La resistencia mediada por plásmidos a polimixinas viene determinada por el gen *mcr-1*, que codifica una proteína con el mismo nombre, que modifica el lípido A alterando la carga resultante de la membrana de forma menos significativa. En consecuencia, los aislamientos que presentan el gen *mcr-1* presentan concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de polimixinas cercanas al punto de corte (79).

d) Tigeciclina y Gliciliclinas

Los mecanismos de resistencia conocidos contra tigeciclina se encuentran a nivel cromosómico, e incluyen modificaciones de las unidades ribosomales 16S y 30S, así como cambios en la permeabilidad celular. La sobreexpresión de bombas de expulsión AcrAB-TolC y OqxAB también contribuye a la resistencia. La resistencia también es mayor en cepas de *K. pneumoniae* con déficit de porina OmpK35 (80). Los genes *tetA* que codifican bombas de expulsión para tetraciclinas también se encontraron en cepas resistentes a tigeciclina, aunque su contribución a la resistencia todavía no está clara (78).

e) Fosfomicina

La fosfomicina es un antibiótico bactericida que inhibe el paso inicial de la biosíntesis del peptidoglicano de la pared celular en procariontes. Tanto el mecanismo de acción como la estructura de este antimicrobiano son únicos, haciendo que la resistencia cruzada sea poco común. Sin embargo, se han descrito distintos mecanismos que confieren resistencia a la fosfomicina. A nivel cromosómico, las mutaciones en el gen *murA* provocan un cambio entre los aminoácidos cisteína y aspartato, convirtiendo en resistentes a las bacterias que lo poseen (*Chlamydia* spp, *Mycobacterium tuberculosis* y *Vibrio fischeri*) (81).

Los mecanismos de resistencia plasmídicos para fosfomicina están mediados por enzimas modificantes, que se clasifican en dos grandes grupos:

1. Metaloenzimas (*FosA*, *FosB* y *FosX*)
2. Enzimas de tipo quinasa (*FomA* y *FomB*) (82)

f) Trimetoprim-Sulfametoxazol

El antibiótico trimethoprim (TMP) es un inhibidor competitivo de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), con la que presenta similitud estructural. El principal mecanismo de resistencia a TMP que presentan las bacterias gramnegativas es la adquisición por transferencia de genes *dfr* o *dhfr*, que codifican enzimas DHFR resistentes a TMP (83). Además, se ha determinado que estos genes pueden estar ubicados tanto a nivel cromosómico como plasmídico (84), siendo el más común entre las bacterias gramnegativas el gen *dfrA1*.

En cuanto a las sulfonamidas, la resistencia transferible está mediada por la familia de genes *SulI* o *sulII* (83).

2.4. Elementos genéticos móviles portadores de mecanismos de resistencia

Los elementos móviles como los plásmidos, integrones y transposones juegan un papel importante en la diseminación de los mecanismos de resistencia antibiótica. Un plásmido es una pequeña molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) circular que a menudo se encuentra en bacterias. Los plásmidos están separados del cromosoma bacteriano y se replican de forma independiente. Por lo general, tienen sólo un número pequeño de genes, algunos de ellos asociados con resistencia a antibióticos.

Las cepas de *K. pneumoniae*, al igual que otras enterobacterias, pueden acumular plásmidos epidémicos mediante conjugación o transformación. La difusión de un plásmido de resistencia es satisfactoria cuando se transfiere a una célula receptora sensible que carece de él y permite la diseminación de la bacteria portadora del plásmido como agente infeccioso (85).

Además, estos plásmidos pueden llevar tanto mecanismos de resistencia como genes de virulencia que incrementan la habilidad de las cepas para resistir en medios hostiles y sobrevivir frente a antimicrobianos de uso terapéutico como cefalosporinas, carbapenémicos, penicilinas, aminoglucósidos o fluoroquinolonas (86).

Muchos microorganismos, entre ellos *K. pneumoniae*, han ido adquiriendo mecanismos de resistencia por adquisición de plásmidos u otro tipo de ADN bacteriano extracromosómico. Las cepas de *K. pneumoniae* pueden acumular plásmidos epidémicos mediante conjugación o transformación. La difusión de un plásmido que contenga genes de resistencia es satisfactoria cuando se transfiere a una célula receptora sensible que carece de él y permite la diseminación de la bacteria portadora del plásmido como agente infeccioso (85).

A priori, la presencia de plásmidos no beneficia a la bacteria hospedadora, puesto que supone una carga de “*fitness*” extra. El “*fitness*” bacteriano se considera como la capacidad de la bacteria de sobrevivir o replicarse. La adquisición horizontal de mecanismos de resistencia está comúnmente asociada a un coste biológico y a una pérdida de “*fitness*” (87).

Sin embargo, en situaciones de presión antibiótica selectiva, un fenotipo de resistencia es fácilmente seleccionable con el uso de antimicrobianos, incrementando su prevalencia y su rápida diseminación (88).

Los plásmidos de resistencia tienen diferentes orígenes y pueden afectar a diversas especies bacterianas. El análisis plasmídico permite identificar plásmidos epidémicos idénticos que se encuentren en diferentes clones dentro de una especie bacteriana (89). *K. pneumoniae* normalmente puede llevar más de un plásmido, tanto de pequeño tamaño, pero con alto número de copias, como de gran tamaño con bajo número de copias (90).

Cuando dos plásmidos diferentes cohabitan en una célula hospedadora y compiten por factores que promueven la replicación o segregación, se da la incompatibilidad. El grado de incompatibilidad depende del número de copias de cada plásmido y su velocidad de replicación, ya sea de forma ordenada o aleatoria (91).

Los integrones, por otro lado, son elementos genéticos en los que se pueden insertar genes, entre ellos genes de resistencia antimicrobiana, gracias a un mecanismo de recombinación específico (92,93). Los integrones probablemente no son móviles, pero se diseminan en transposones o plásmidos conjugativos, asegurando así su difusión entre bacterias (93).

La estructura general de los integrones consiste en dos segmentos de ADN conservados (extremo 5' [5'CS] y extremo 3' [3'CS]), separados por una región variable donde se encuentran los "cassettes" genéticos, que son pequeños elementos genéticos móviles (**figura 1.10**). En la región 5'CS se encuentra la integrasa (*intI*), encargada de catalizar la recombinación específica de sitio, la integración y la escisión de los casetes de genes y que permite clasificar los integrones en clases, siendo la clase I la más frecuente en las cepas clínicas (93). En esta zona conservada, también se encuentran el lugar de recombinación específico (*attI*) y los promotores necesarios para expresar los genes que se encuentran en los "cassettes" de resistencia de la zona variable. En la región 3'CS, se encuentran el gen de resistencia a compuestos de amonio cuaternario presentes en algunos

antisépticos y desinfectantes (*qacEA1*) y el gen que determina la resistencia a las sulfonamidas (*sul1*) (92).

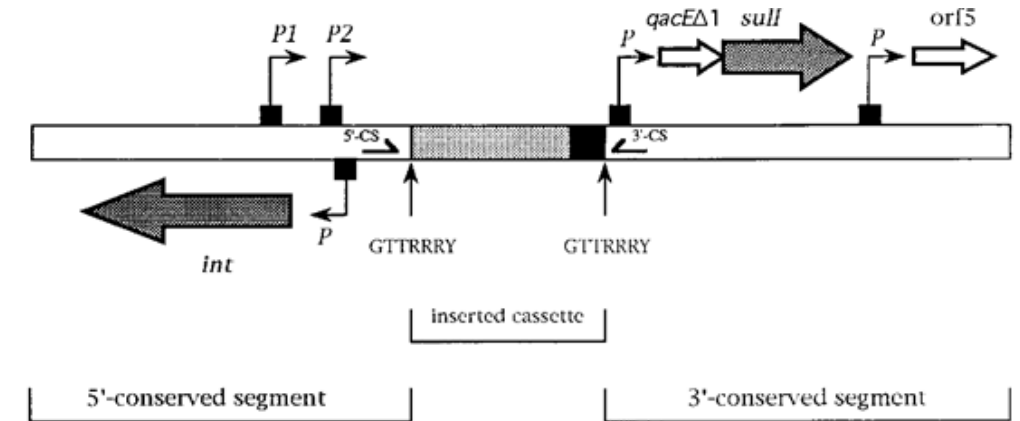


Figura 1.10. Estructura general del integrón de clase I (75)

El mapeado de los integrones mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación es una herramienta epidemiológica útil para estudiar la evolución de estos mecanismos que diseminan los genes de resistencia antibiótica, su expresión genética y su posición en el integrón (94). Los integrones probablemente no son móviles, pero se diseminan en transposones o plásmidos conjugativos que aseguran su difusión entre bacterias (93,95).

2.5. Epidemiología de la resistencia antibiótica en *Klebsiella pneumoniae*

Desde que comenzaron a utilizarse los antibióticos de amplio espectro en las décadas de los años 50 y 60 para el tratamiento de bacterias gramnegativas, las enterobacterias han adquirido diversos mecanismos para evadir la acción de los antimicrobianos y en particular enzimas β -lactamasas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico de penicilinas y cefalosporinas. A mediados de los años 70 se comercializaron dos cefalosporinas estables a la acción de las β -lactamasas: cefamandol y cefuroxima (96,97), seguidos de la cefotaxima y ceftazidima a principios de los años 80 (98). A pesar de ello, rápidamente emergieron β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) con actividad hidrolítica frente a estos nuevos fármacos (99). Desde entonces, las enterobacterias productoras de BLEE se han diseminado a nivel mundial y es frecuente la asociación de resistencia a otros antibióticos como fluorquinolonas y aminoglucósidos. En 1985, una nueva clase de antibióticos β -lactámicos, los carbapenémicos, fueron introducidos en la práctica clínica. Los carbapenémicos se caracterizan por su amplio espectro y por tener una gran estabilidad frente a las β -lactamasas, incluyendo las enterobacterias productoras de BLEE. Por este motivo, una de sus principales indicaciones es el tratamiento de infecciones por bacterias productoras de BLEE. Las primeras carbapenemasas (enzimas capaces de hidrolizar carbapenémicos) identificadas en enterobacterias fueron en Reino Unido, en dos cepas de *Serratia marcescens* que habían sido aisladas en 1982. Estas enzimas, SME-1, eran del tipo serin-carbapenemasa y tenían una localización cromosómica (100). No obstante, las primeras carbapenemasas transferibles descritas en Gram negativos fueron de la clase metalo- β -lactamasa del tipo IMP en un aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* en Japón en 1991 (101) y posteriormente en este mismo país, pero en *Serratia marcescens* (102). En 2001 se describió la primera enterobacteria productora de carbapenemasa (EPC) del tipo KPC-1 en Carolina del Norte (103), y desde entonces se ha diseminado a otros estados de Estados Unidos y a otros países como Costa Rica, Colombia y, fundamentalmente, Israel y Grecia (104). A principios de 2003 se produjo una diseminación de EPC de tipo VIM en hospitales de Grecia (105) junto con algunos brotes en hospitales de Francia y

España (106,107). Desde 2008, se han descrito continuas entradas a Europa de EPC tipo NDM-1 desde India a Reino Unido, Austria, Bélgica, Francia, Alemania, Holanda, Noruega y Suecia (108,109). En 2006 se describieron los primeros casos de EPC OXA-48 en el contexto de un brote en un hospital de Turquía (110) con posterior diseminación a países de la cuenca mediterránea, África y Europa (111). Un aspecto importante a destacar es que, con frecuencia, las EPC son también portadoras de otros determinantes que confieren resistencia, tanto a β -lactámicos como a otros grupos de antibióticos, contribuyendo a la aparición de los fenómenos de multirresistencia, resistencia extrema o incluso panresistencia antibiótica (112).

El informe de resistencia antimicrobiana del ECDC (113) recoge que, en el año 2020, más de la mitad de los aislados de *Escherichia coli* y más de un tercio de los aislados de *K. pneumoniae* obtenidos en muestras invasivas informados fueron resistentes al menos a una familia antimicrobiana, siendo frecuente la resistencia combinada a varias familias de antimicrobianos. Los porcentajes de resistencia a carbapenems fueron más elevados en *K. pneumoniae*, aproximadamente un 10% por encima de *E. coli*, donde la resistencia a estos antimicrobianos no fue habitual (113).

En la **figura 1.11** se observan los porcentajes de resistencia a carbapenems en muestras invasivas en Europa de *K. pneumoniae*. Destacan países como Grecia, con una resistencia superior al 50%, mientras que países como España y Francia mantienen porcentajes bajos (entre 1 y <5%).

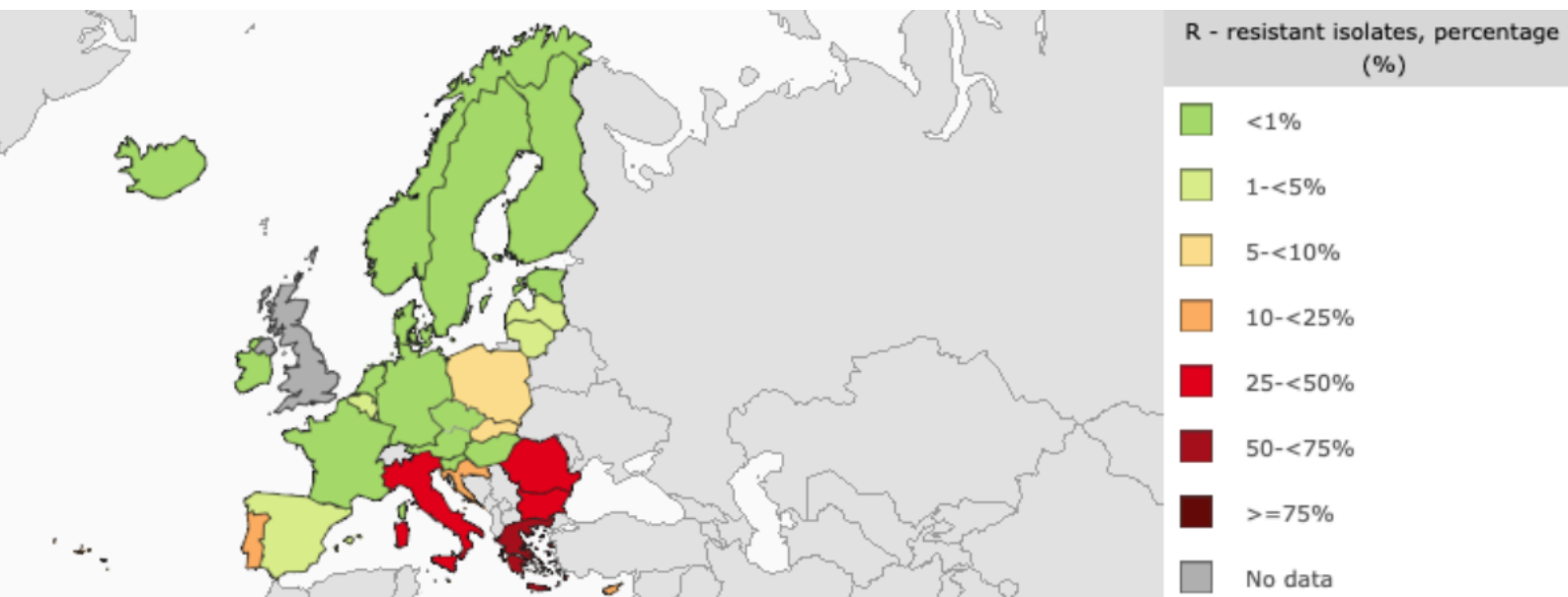


Figura 1.11. Distribución de la resistencia a carbapenems en cepas de *K. pneumoniae* aisladas en muestras invasivas en Europa durante el año 2020 (116)

3. Caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae*

3.1. Tipificación de los aislados

Los estudios epidemiológicos se realizan con el fin de conocer la relación genética entre aislamientos bacterianos que pueden estar vinculados epidemiológicamente (114).

El término clon o complejo clonal en epidemiología, hace referencia al grupo de aislamientos que descienden de un ancestro común, o que proceden directamente de la misma fuente o de la misma cadena de transmisión. Estos aislamientos mantienen un nivel de similitud genética elevado, mucho mayor que el de los aislamientos seleccionados arbitrariamente, sin relación epidemiológica.

Los sistemas de tipificación molecular constituyen una de las aportaciones microbiológicas que más difusión han tenido en los últimos años. Estos sistemas comprenden una gran variedad de técnicas que tienen como objeto comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos. De este modo, se puede reconocer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente y, por tanto, derivados recientes de un microorganismo precursor común. A la vez, deben ser técnicas capaces de diferenciar aislamientos no relacionados, independientemente de su pertenencia a la misma especie microbiológica o taxón.

Existen distintas técnicas moleculares para la realización de estos estudios, entre las cuales destacan la restricción del ADN cromosómico mediante electroforesis de campo pulsado y la secuenciación de fragmentos internos de genes metabólicos muy conservados (del inglés *Multilocus Sequence Typing*, MLST). El objetivo de ambas técnicas es comparar la composición de los ácidos nucleicos de dos o más microorganismos y reconocer, de este modo, la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente (115).

El interés de estas técnicas radica en su capacidad para establecer la relación genética que existe entre aislados implicados en un brote, además de ser herramientas muy útiles para confirmar la fuente de infección o reservorio (116).

3.1.1. Análisis del ADN cromosómico mediante macrorrestricción: Electroforesis en campo pulsante (PFGE)

La técnica de PFGE consiste en la macrorrestricción de ADN con enzimas de restricción de baja frecuencia de corte y su posterior separación mediante la aplicación de campos eléctricos cuya orientación varía periódicamente. De esta manera se consigue la división del ADN en pocos fragmentos (entre 10 y 30) y se obtienen patrones de restricción sencillos con los que se puede establecer una relación epidemiológica entre las cepas que se estudian. La visualización de los fragmentos de ADN se consigue tras exponer el gel teñido con un colorante muy sensible con elevada afinidad por el ADN a la luz ultravioleta.

La técnica de PFGE es una de las técnicas "*gold standard*" en los estudios de epidemiología a nivel nacional e internacional. Su origen data de 1984, cuando Schwartz y Cantor idearon una manera de separar moléculas grandes de ADN. Este método ha tenido una gran aceptación y aplicabilidad como técnica de tipificación molecular (117).

En general, sus resultados han demostrado ser suficientemente discriminativos, con excelente reproducibilidad y fáciles de interpretar cuando se estudian colecciones de microorganismos aisladas en un periodo de tiempo corto. Al aplicar estas técnicas al estudio de brotes de infección nosocomial endémicos, hay que tener en cuenta que la rentabilidad de la técnica variará en función del momento del brote. Por ejemplo, al principio del brote es probable que la diversidad genética sea baja, mientras que más tarde, al irse acumulando cambios genéticos en las cepas epidémicas/endémicas, se incrementará la diversidad de los patrones de PFGE.

A la hora de interpretar los patrones de PFGE, debe examinarse la colección completa de cepas a estudiar en busca de un patrón epidémico, que sería el más común entre los aislamientos. A continuación, todos los otros patrones deben compararse con éste y a la vez entre sí. Es preciso contabilizar y analizar el número de fragmentos distintos de cada cepa con todas las demás.

En función del número de diferencias entre dos patrones se clasifican los aislamientos en:

1. Idénticos. Cuando los dos aislamientos presentan el mismo número de bandas y éstas tienen aparentemente el mismo tamaño. En este caso ambos aislamientos representan la misma cepa.
2. Genéticamente relacionados. Cuando el número de diferencias entre los dos aislamientos sea inferior o igual a 3. Esto es debido a que un único cambio genético, en el más desfavorable de los casos (mutación espontánea que afecte a un lugar de restricción: creando uno nuevo o haciendo desaparecer uno ya existente), se traduce en un máximo de tres diferencias entre los patrones de un aislamiento y su ancestro. En este caso, las dos cepas pueden considerarse genéticamente relacionadas (una subtipo de la otra o ambas derivadas de un ancestro común) y sus diferencias pueden ser la consecuencia de los cambios genéticos que se acumulan en las sucesivas generaciones bacterianas.
3. Posiblemente relacionados. Cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de cambios puede llegar a ser hasta de 6 (inserciones o deleciones de ADN o ganancia o pérdida de lugares de restricción). Aunque estos aislamientos puedan también corresponder a una línea evolutiva común, su relación genética no es tan cercana y por tanto, es menos probable su relación epidemiológica.
4. No relacionados. Cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias entre los dos patrones superior a 6. En este caso interpretaremos que las dos cepas pertenecen a clones distintos, sin relación epidemiológica (118).

Esta clasificación de la relación genética entre microorganismos, pretende ser sólo orientativa. Es necesario individualizar cada situación, tener en cuenta otras características de los microorganismos y sobre todo, la información epidemiológica que deriva de una investigación clínica cuidadosa.

Un inconveniente importante de esta técnica es el derivado de la interpretación de los patrones de bandas obtenidos, que es subjetiva en la mayoría de los casos, y de la ausencia de un sistema normalizado que permita cuantificar uniformemente la distancia genética.

Los patrones de PFGE se pueden analizar también mediante sistemas informáticos que objetivan el número de diferencias entre dos aislamientos y les asignan una distancia genética. En estos sistemas, se precisa captar la imagen del gel, normalizarlo e identificar las bandas que se quieren analizar. Son sistemas muy útiles para analizar colecciones que incluyen muchos microorganismos.

Finalmente, cabe destacar que las técnicas de macrorrestricción y PFGE no detectan cambios puntuales en genes ni permiten la observación detallada de ciertos elementos genéticos (plásmidos, transposones, secuencias de inserción, etc.). Por tanto, para abordar algunos problemas epidemiológicos en los que intervengan estas secuencias, se requiere la combinación con otras técnicas.

3.1.2. Análisis del ADN por secuenciación: *Multilocus sequence typing* (MLST)

El análisis del ADN por secuenciación es una técnica desarrollada y diseñada para identificar clones y/o líneas clonales, fundamentalmente en poblaciones bacterianas. El MLST es un marcador molecular de aplicación en epidemiología global o a largo plazo, que permite identificar grupos poblacionales con independencia de pequeñas variaciones que puedan surgir geográfica y/o temporalmente.

El método consiste en las variaciones de los diferentes locus que se detectan de forma directa por secuenciación del ADN en fragmentos de genes seleccionados, permitiendo la identificación de grupos de microorganismo con genotipos idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales). El análisis se basa en la secuencia del ADN de fragmentos internos de genes "*housekeeping*" que codifican enzimas metabólicos. El hecho de utilizar enzimas metabólicos, no sometidos a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen

líneas clonales relativamente estables. Cada variante es definida como “variante alélica” y los diferentes alelos de cada uno de los genes conforman el perfil alélico. El esquema MLST se basa en 7 genes para las diferentes especies bacterianas en las que se ha desarrollado, entre ellas *K. pneumoniae* (119).

Los 7 genes estudiados para *K. pneumoniae* son:

- *rpoB* (beta-subunidad de la ARN polimerasa)
- *gapA* (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa)
- *mdh* (malato deshidrogenasa)
- *pgi* (fosfoglucoasa isomerasa)
- *phoE* (fosforina E)
- *infB* (factor de iniciación de la traducción 2)
- *tonB* (transductor de la energía periplásmica)

La identificación de cada uno de los 7 alelos genera un perfil alélico que consiste en una secuencia de 7 números. A partir de este momento la comparación entre aislados es sencilla, comprobando con facilidad el grado de proximidad entre los aislados, mediante el simple análisis del número de alelos compartidos entre perfiles diferentes. Cada perfil alélico define lo que se conoce como tipo de secuencia o “*sequence type*” (ST) (ver **figura 1.12**).

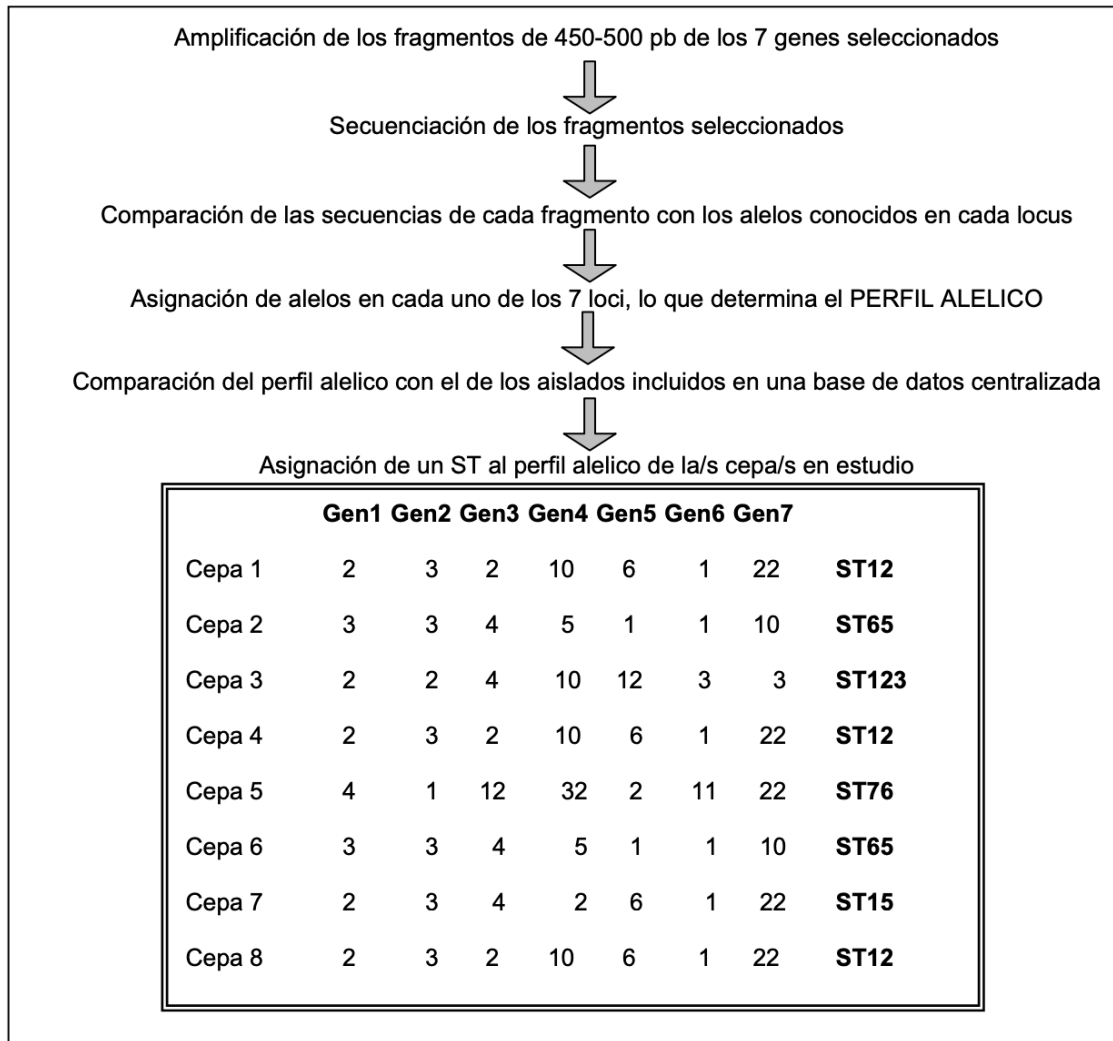


Figura 1.12. Esquema de trabajo para el análisis mediante la técnica de MLST (115)

MLST es una técnica diseñada para el seguimiento de clones y/o líneas clonales, fundamentalmente en poblaciones bacterianas. MLST consigue trazar procesos de dispersión, identificando con gran precisión grupos poblacionales específicos con independencia de pequeñas variaciones que puedan surgir geográfica y/o temporalmente.

Por tanto, es un marcador molecular indicado en lo que se conoce como epidemiología global a largo plazo.

4. Secuenciación del genoma completo

De forma general, el genoma es el conjunto de material genético hereditario que posee un organismo vivo y que determina su capacidad de adaptación a las diferentes condiciones ambientales y nutricionales.

A nivel bioquímico, e independientemente de su origen, todas las moléculas de ADN son idénticas. Dichas macromoléculas están compuestas por nucleótidos unidos por medio de enlaces fosfodiéster entre los carbonos de las posiciones 3' y 5' de dos residuos de azúcares adyacentes; siendo el orden de la secuencia de nucleótidos que conforma esta macromolécula el determinante de las diferentes características biológicas en una especie. De igual forma, las diferencias fenotípicas observadas entre miembros de una misma especie vienen determinadas por cambios en esta secuencia de nucleótidos.

En los últimos años, el constante desarrollo y la continua mejora de los métodos de secuenciación del ADN ha permitido que la obtención de la secuencia de genoma completo sea accesible en la rutina de los Servicios de Microbiología Clínica, introduciendo así un nuevo paradigma en el diagnóstico microbiológico (120).

Este nuevo paradigma implica el manejo de una gran cantidad de información, cuya gestión y análisis demanda inexorablemente el uso de herramientas bioinformáticas lo cual no debiera ser un obstáculo para su implementación en los Servicios de Microbiología Clínica ya que en los últimos años se han desarrollado aplicaciones web y/o interfaces que permiten una fácil utilización de muchas de estas herramientas sin la necesidad de requerir grandes conocimientos en lenguajes de programación.

Desde que en 1995 Fleischmann y colaboradores publicasen la secuencia de genoma completo de *Haemophilus influenzae* (121), se han producido numerosos avances en el campo de la biología molecular que, junto a los numerosos avances tecnológicos, han permitido el desarrollo de nuevas y eficientes tecnologías de secuenciación del ADN (122,123). Así, en la actualidad,

conviven diferentes generaciones de secuenciadores cuyas bases científicas y tecnológicas son distintas, resultando complementarias en muchas ocasiones.

4.1. Secuenciación de primera generación: Sanger

El método propuesto por Sanger-Coulson, o de terminación de la cadena, se basa en la síntesis secuencial de una hebra de ADN complementaria a la hebra de cadena simple cuya secuencia quiere determinarse, residiendo la clave del método en la adición de dideoxynucleótidos o nucleótidos de parada a la mezcla de la reacción ya que, al carecer estos nucleótidos del grupo 3'-OH, su adición resulta en la interrupción de la síntesis. Así, la secuenciación de Sanger-Coulson consiste en llevar a cabo 4 reacciones independientes conteniendo cada una de las mezclas de reacción la hebra molde, la ADN polimerasa, un cebador marcado, los cuatro 2'-deoxynucleótidos (dNTP) y uno de los cuatro dideoxynucleótidos (ddNTP) en menor proporción. Finalizado el proceso de síntesis, la adición aleatoria de estos nucleótidos de parada resulta en la obtención de 4 mezclas de fragmentos de diferente tamaño interrumpidos por el ddNTP correspondiente que, al ser separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, permiten elucidar la secuencia de nucleótidos de la cadena de ADN molde gracias al marcaje incorporado al cebador.

La automatización de la secuenciación Sanger supuso una revolución en el campo de la genética humana, actuando como catalizador de proyectos tan ambiciosos para la época como el Proyecto Genoma Humano; proyectos que, a su vez, han propiciado el desarrollo de nuevas generaciones de secuenciadores.

No obstante, a pesar de la fuerte irrupción de estas nuevas generaciones de secuenciadores y de la necesidad de cierto conocimiento previo sobre la secuencia a resolver, los secuenciadores Sanger tuvieron y continúan teniendo un importante papel en numerosas investigaciones y aplicaciones microbiológicas. Así, por ejemplo, la secuenciación Sanger continúa siendo ampliamente utilizada para la identificación taxonómica de aislados microbiológicos mediante secuenciación del gen que codifica la subunidad menor del ARN ribosómico 16S (124).

4.2. Secuenciación de segunda generación: Masiva

La secuenciación masiva engloba toda una generación de secuenciadores que utilizan diferentes tecnologías, estrategias y aproximaciones, cuya característica común es su habilidad para llevar a cabo de forma simultánea millones de reacciones de secuenciación en paralelo a un precio asequible y en un tiempo relativamente corto. Los secuenciadores masivos o de segunda generación difieren en muchos aspectos con los secuenciadores tipo Sanger. Una de las principales diferencias es la realización simultánea de millones de reacciones de secuenciación de fragmentos muy cortos que pueden asignarse a cada una de las muestras que se analizan simultáneamente gracias a la preparación previa de unas librerías etiquetadas (multiplexado) que se inmovilizan sobre una matriz bidimensional.

Las técnicas de secuenciación de alto rendimiento se introdujeron en el mercado en 2005 teniendo un gran impacto en genómica (transcriptómica y epigenómica) con la secuenciación del genoma completo. Por ahora no es un método de tipificación habitual en los laboratorios clínicos, pero se está introduciendo poco a poco, gracias a su gran utilidad (125). El desarrollo de estas nuevas tecnologías permite, entre un amplio rango de aplicaciones, la secuenciación de microorganismos como *K. pneumoniae*, aportando información sobre la presencia de genes de resistencia, genes de virulencia y elementos genéticos móviles, entre otros (126). Tanto la inversión como los costes de realización han disminuido de manera notable durante la última década (127). Por este motivo, las técnicas de secuenciación masiva ya se utilizan para el estudio de brotes epidémicos, caracterización y vigilancia de distintos patógenos, identificación de factores de virulencia, y detección de genes de resistencia a antibióticos, aunque no de forma rutinaria en el ámbito clínico.

Generalmente, el flujo de trabajo de secuenciación masiva en un laboratorio clínico incluye: selección, recogida de la muestra y preparación de la misma, extracción de ácidos nucleicos, preparación de librerías, secuenciación, análisis de datos y almacenamiento de los mismos (126).

Una vez seleccionada la muestra y extraídos los ácidos nucleicos, se lleva a cabo la preparación de la librería. Consiste en la obtención de fragmentos cortos de ADN, que van a variar según las plataformas utilizadas, pero que habitualmente rondan entre 150 y 400 pares de bases. Durante la preparación, se añaden adaptadores a ambos extremos de cada uno de los millones de fragmentos de ADN a secuencias, siendo un punto clave en la secuenciación masiva de segunda generación. De esta forma, se obtienen fragmentos flanqueados por adaptadores con secuencias específicas, lo que permite realizar millones de reacciones a la vez para obtener la secuencia de cada inserto. En la figura 1.13 se representa el proceso de la preparación de librerías.

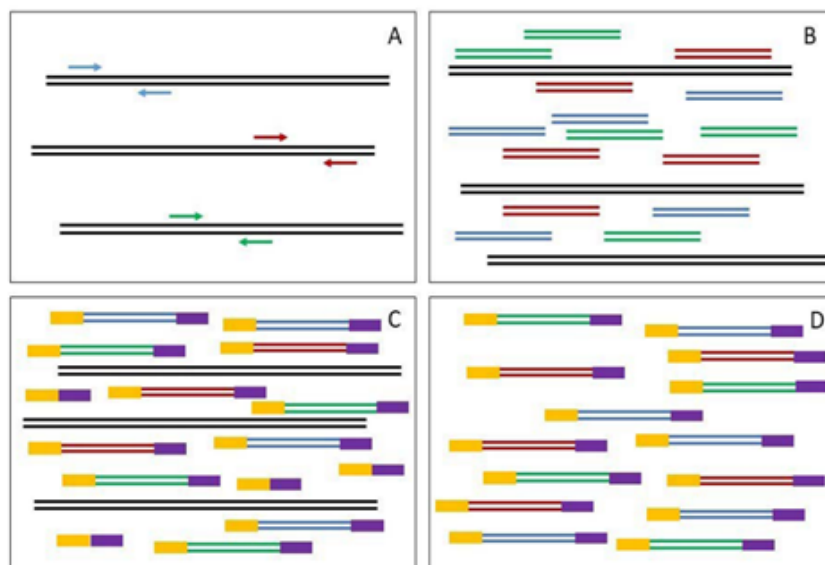


Figura 1.13. Las regiones de interés son amplificadas a partir de ADN genómico (doble hebra, color negro) por medio de cebadores específicos (flechas de color azul, rojo y verde) (A). Se obtienen múltiples copias de regiones amplificadas (B), y luego se añaden adaptadores para la construcción de la biblioteca (amarillo y violeta) (C). Por último, la biblioteca es purificada para eliminar ADN genómico y los dímeros de adaptadores (D) (128)

Una vez preparadas las librerías, éstas se fijan a una superficie bidimensional donde se amplifican *in vitro*. Para ello existen diferentes estrategias. De todas ellas, la más sencilla es la

utilizada por los secuenciadores de Illumina y denominada amplificación puente (bridge amplification). En esta estrategia los cebadores necesarios para el inicio de la reacción de amplificación se encuentran inmovilizados sobre una superficie bidimensional. Las muestras quedan inmovilizadas y en disposición para el inicio de la amplificación clonal de todas las muestras en paralelo y simultáneamente ya que los cebadores complementarios a una parte de los identificadores incorporados en la preparación de librerías. Otras estrategias alternativas incluyen la amplificación en emulsión o la amplificación en nanobolas (*rolling-circle amplification*).

Finalmente, una vez amplificados los fragmentos de ADN, se produce la reacción de secuenciación para la cual también se han desarrollado diferentes estrategias. Una de estas estrategias es la pirosecuenciación, cuya base es la utilización de nucleótidos cuya incorporación a la hebra complementaria en síntesis conlleva la liberación de pirofosfatos que, en última instancia, generan luz que puede detectarse permitiendo así elucidar la secuencia de nucleótidos. Otra estrategia ampliamente utilizada es la denominada secuenciación por síntesis (SBS, *sequencing by synthesis*). En esta aproximación la reacción de síntesis consiste en la incorporación secuencial y reversible de nucleótidos marcados con fluoróforos distintos que impiden además la adición posterior de más nucleótidos; de esta forma, en cada paso se produce la adición de un único nucleótido a cada uno de los fragmentos en síntesis cuya señal fluorescente es captada y traducida a nucleótidos. Finalmente, otra aproximación ampliamente utilizada es la denominada secuenciación mediante ligación (SBL, *sequencing by ligation*) que no utiliza ADN polimerasas y cuya base reside en la utilización de una mezcla de sondas marcadas con fluoróforos que se unen mediante ligasas específicas. Por tanto, es importante conocer la estrategia química de secuenciación en que se basa el secuenciador ya que determina en gran medida sus características y prestaciones (**Tabla 1.4**). De entre las diferentes tecnologías de secuenciación masiva actualmente disponibles, la tecnología Illumina es la más extendida en el ámbito clínico dado que su alto rendimiento y la precisión de las lecturas generadas la hacen idónea para la mayoría de las aplicaciones de la secuenciación masiva en Microbiología Clínica.

Tabla 1.4. Características de las distintas plataformas de secuenciación

Plataforma	Secuenciador	Amplificación librería	Tecnología de la secuenciación	Longitud máxima de las lecturas	Tiempo carrera	Coste
ABI Sanger	Sea Studio/ 3500 series/ Refreshed 3730	No aplica	Sanger	>= 800 pb	30 minutos	\$
Illumina	MiSeq	Puente (bridge-PCR)	Secuenciación por síntesis	300x2 pb	4-56 H	\$\$
	NextSeq	Puente (bridge-PCR)	Secuenciación por síntesis	150x2 pb	11-29 H	\$\$
	HiSeq 4000	Puente (bridge-PCR)	Secuenciación por síntesis	150x2 pb	1-3,5 días	\$\$
Ion Torrent	PGM	PCR en emulsión	Secuenciación por ligación	400 pb	2-7 H	\$\$
	S5 series	PCR en emulsión	Secuenciación por ligación	600 pb	3-21,5 H	\$\$
PacBio	RS	No aplica	Single-molecule real- time sequencing (SMRT)	10-15 kb	4H	\$\$\$
	Sequel	No aplica	Single-molecule real- time sequencing (SMRT)	10-15 kb	4H	\$\$\$
Oxford Nanopore	MiniON	No aplica	Single-molecule real- time sequencing (SMRT)	10-20 kb	1-48 H	\$\$\$

4.3. Análisis bioinformático

Dado que en el secuenciador se introduce una mezcla equimolar de un conjunto de muestras, el primer paso en el análisis bioinformático es un proceso conocido como “demultiplexado”. Generalmente, este proceso lo realiza el propio secuenciador y consiste simplemente en la clasificación del total de lecturas generadas en función de los oligonucleótidos flanqueantes en las mismas, de tal forma que, a partir de un fichero único de lecturas, se generarán tantos ficheros de lecturas como muestras se hayan secuenciado.

Posteriormente, se debe evaluar la calidad de las lecturas obtenidas. FastQC (129) y Prinseq-lite (130) son recursos frecuentemente utilizados para este fin. El siguiente paso consiste en eliminar las lecturas erróneas que se hayan generado durante la secuenciación. Los errores, pueden afectar a la totalidad de la lectura o solamente a una parte específica de las mismas siendo necesario filtrar y limpiar estos errores con herramientas como Prinseq-lite o Trimmomatic (131).

4.3.1. Alineamiento y análisis de variantes

La disponibilidad de un genoma de referencia adecuado sobre el cual alinear las lecturas procesadas es clave a la hora de realizar un alineamiento y su posterior análisis de variantes.

El mapeo o alineamiento es sencillo: primero se indexa el genoma de referencia y posteriormente se alinean las lecturas frente a él. Tras visualizar el alineamiento se puede proceder al análisis de variantes de las lecturas generadas con respecto al genoma de referencia, para lo cual pueden emplearse herramientas incluidas en paquetes informáticos como *samtools* o *bcftools* (132,133).

4.3.2. Ensamblaje *de novo*

Cuando se quiere explorar el genoma accesorio presente en un aislado microbiológico o en el caso de no disponer de un genoma de referencia adecuado para el alineamiento, procederemos al ensamblado *de novo* de las lecturas. El genoma accesorio de un microorganismo comprende el conjunto de genes cromosómicos no compartidos por todos los miembros de una misma especie y todo el conjunto de genes adquiridos por transferencia horizontal, genes que con frecuencia

codifican determinantes de resistencia a los antibióticos y factores de virulencia. Existen diferentes herramientas que permiten el ensamblado *de novo* de genomas y metagenomas, siendo SPAdes la herramienta más utilizada en la actualidad (134). SPAdes es una herramienta de línea de comando de fácil utilización que puede trabajar y producir buenos resultados tanto con lecturas cortas como largas, pudiendo incluso realizar ensamblados híbridos combinando ambos tipos de lecturas. El resultado que se obtiene de la unión de estas lecturas son una serie de secuencias más largas que se denominan *contigs*. Idealmente, un ensamblado *de novo* debería tener tantos *contigs* como estructuras genéticas independientes (cromosomas, plásmidos, etc) estén presentes en la muestra secuenciada; sin embargo, en la práctica la presencia de regiones repetitivas en dichas estructuras genéticas impide la generación de grandes *contigs*.

4.3.3. Anotación genómica

La anotación genómica es un proceso mediante el cual podemos identificar los genes contenidos en las secuencias generadas y predecir su funcionalidad por homología con genes/proteínas previamente caracterizadas y depositadas en bases de datos (135). Este proceso, aunque no es habitual en la práctica clínica, puede resultar interesante en situaciones en las que con otras aproximaciones no logramos encontrar una explicación al fenotipo observado.

4.3.4. Detección de mecanismos de resistencia

La resistencia a los antibióticos está, en general, codificada en el genoma bacteriano, por lo que la aplicación de la secuenciación masiva tiene el potencial teórico de predecir el fenotipo de resistencia en un microorganismo dado.

Existen una serie de recursos para la detección y caracterización de genes y mecanismos relacionados con la resistencia antibiótica. Mayoritariamente, estos recursos están enfocados a la detección de determinantes de resistencia adquiridos por vía horizontal aunque algunos de ellos también incluyen discretas colecciones de mutaciones cromosómicas relacionadas con la resistencia a los antibióticos. Estos recursos utilizan distintas herramientas de análisis (*read-based*, *assembly-based* o *k-mers-based*), no existiendo un consenso en cuanto a qué metodología es

mejor y dependiendo su elección mayoritariamente del tipo de análisis (genómico/metagenómico) y de la disponibilidad de recursos computacionales. En general, en análisis de genoma completo suelen preferirse los métodos basados en ensamblaje (*assembly-based*) ya que éstos proporcionan información adicional sobre el entorno en el que se encuentran los genes de resistencia, reservándose los métodos basados en lecturas o *k-meros* (*read-based* o *k-mers-based*) para el estudio de metagenomas dada su demostrada mayor sensibilidad en la detección de genes presentes en baja abundancia (136).

4.3.5. Detección de genes de virulencia y de elementos genéticos móviles

La secuenciación masiva como herramienta para la detección de los determinantes de resistencia y virulencia supone una gran ventaja frente a otras técnicas moleculares al permitir detectar y conocer el entorno genético de todos los elementos presentes en una sola prueba. Existen recursos bioinformáticos como las bases de datos *Virulence Finder* o *Plasmid Finder* que permiten la detección de estos elementos (137).

4.3.6. Tipado molecular: Epidemiología global y caracterización de brotes. Análisis filogenómico

La tipificación bacteriana engloba un conjunto de técnicas mediante las cuales se persigue discernir si dos o más aislados están genéticamente relacionados, siendo por tanto una herramienta fundamental para la realización de estudios filogenéticos, vigilancia epidemiológica global e investigación de brotes.

En comparación con las técnicas de tipificación bacteriana clásicas, la secuenciación de genoma completo nos revela la totalidad de genes contenidos, así como las variaciones presentes en ellos, ofreciendo por tanto el máximo poder de resolución y discriminación (138,139). La secuenciación de genoma completo ha sido frecuentemente empleada para la caracterización de brotes de origen alimentario, donde se perfila como la herramienta de vigilancia del futuro (140) al haber demostrado su mayor poder discriminativo en comparación con la PFGE y otras técnicas basadas en la PCR.

La filogenómica se entiende como la reconstrucción de la historia evolutiva de una serie de microorganismos a partir del estudio de sus genomas completos, reconstrucción que, junto a los métodos anteriormente expuestos, puede ser de gran utilidad en la caracterización de un brote, ya que si los aislados sospechosos se agrupan formando un grupo monofilético o clado se puede concluir que dichas especies comparten un mismo ancestro común. Todo análisis filogenómico parte de un alineamiento previo, generalmente obtenido por mapeo frente a una referencia, cuya calidad determinará la validez de los resultados que se obtengan. Por ello, el primer paso del análisis filogenómico consistirá en asegurarnos de que el alineamiento es correcto. Para ello disponemos de herramientas de código libre que nos permiten visualizar y editar los alineamientos como AliView (141), otras que nos permiten eliminar de forma objetiva zonas mal alineadas, como GBlocks o TrimAl (142,116), e incluso algunas que nos permiten detectar la presencia de secuencias erróneas o mal alineadas, como evalmsa (138). Validados los alineamientos de todos los aislados en estudio, generaremos un archivo multiFasta que contendrá tantas secuencias como aislados estemos analizando, secuencias que tendrán la misma longitud. Idealmente, estas secuencias debieran tener la misma longitud que el genoma utilizado como referencia; no obstante, es frecuente construir secuencias consenso que únicamente contienen las posiciones de la referencia cubiertas en todos los aislados. Posteriormente, procederemos a la construcción del árbol filogenético para lo cual pueden emplearse programas de uso sencillo como MegaX (143), o bien otros más complejos, pero que suelen ofrecer mejores resultados, como IQTree (144). Finalmente, podemos visualizar los árboles filogenéticos generados en visualizadores como FigTree (145).

En la **figura 1.14** se muestra de forma detallada el flujo de trabajo en el análisis bioinformático tras la realización de la secuenciación masiva.

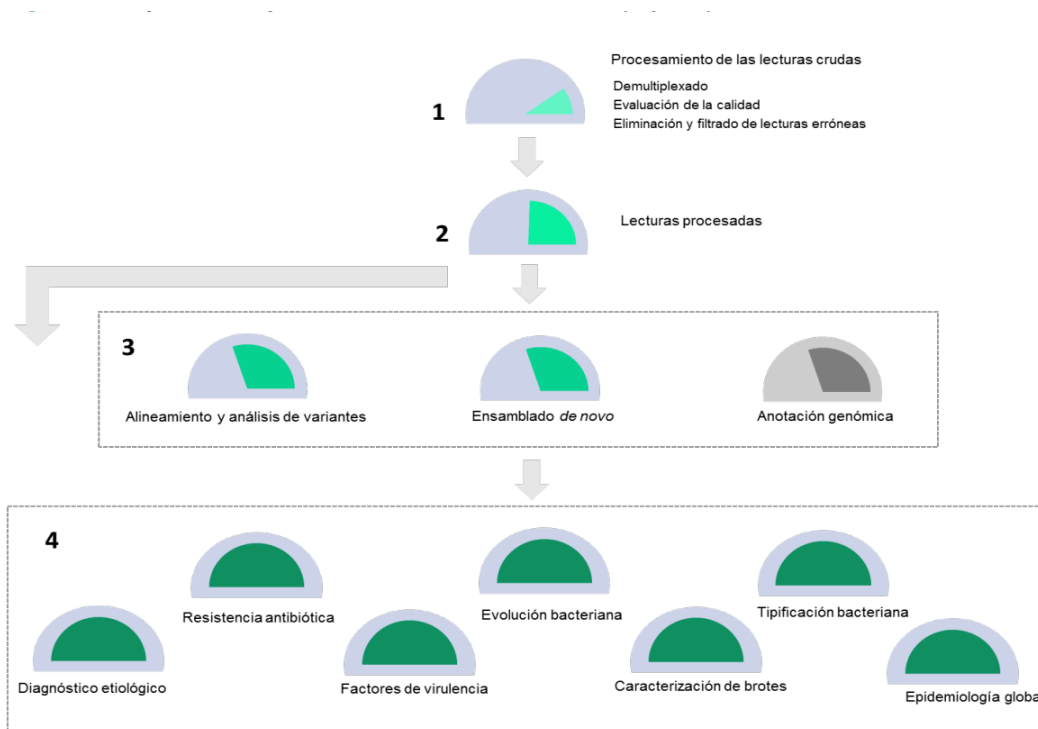


Figura 1.14. Flujo de trabajo en el análisis bioinformático (128)

La implementación de la secuenciación masiva en los Servicios de Microbiología Clínica está acompañada de numerosos retos y limitaciones. No obstante, su uso está cada vez más extendido, perfilándose como la herramienta del futuro para la vigilancia epidemiológica global. Además, se trata de una herramienta universal aplicable en ausencia de sospecha etiológica previa lo que la hace especialmente interesante en Microbiología Clínica dado el gran número de enfermedades infecciosas de etiología desconocida. Asimismo, la posibilidad de descifrar todo el contenido genómico del agente causal de la infección en una sola prueba la posiciona como la herramienta diagnóstica del futuro.

5. *Klebsiella pneumoniae* multirresistente en el ambiente hospitalario. Brotes nosocomiales

En los últimos años se ha observado un aumento importante de los microorganismos multirresistentes (MMR) en el ambiente hospitalario. Esta situación ha sido propiciada principalmente por el uso de antimicrobianos y las particulares características ecológicas de los hospitales, donde es fácil la selección de estos microorganismos y su transmisión entre pacientes (146). Cerca de un 50% de los pacientes hospitalizados está en tratamiento con antimicrobianos durante su ingreso, siendo el porcentaje todavía mayor (60%) en las unidades de cuidados intensivos (UCI) (38).

La infección por MMR se asocia al retraso en el inicio de una terapia antimicrobiana adecuada y a fracaso terapéutico, teniendo como consecuencia estancias hospitalarias más largas y un aumento en el coste y la mortalidad (147). En la mayoría de los casos, la aparición de estos MMR conlleva un aislamiento de contacto de los pacientes, incluso cuando solo están colonizados, con el fin de evitar brotes epidémicos.

Las infecciones nosocomiales causadas *K. pneumoniae* multirresistente son especialmente problemáticas en las unidades pediátricas y de neonatos, unidades de quemados y sobre todo en las UCI (148).

La capacidad que este microorganismo tiene para diseminarse se traduce en la aparición de brotes nosocomiales, cuyo principal reservorio es la colonización del tracto digestivo de los pacientes hospitalizados.

La mayor parte de los brotes de infección nosocomial causados por *K. pneumoniae* descritos en la literatura en la década de los 70 son debidos a cepas resistentes a aminoglucósidos (22). En la década de 1990 a 2000 se comenzaron a describir brotes por cepas productoras de BLEE (149), mientras que los causados por cepas productoras de carbapenemasas se describen a partir de los años 2000 (150).

Las infecciones nosocomiales por *Klebsiella* spp. se diferencian de las producidas en la comunidad en tres aspectos:

- Las cepas que las producen no presentan la variabilidad geográfica observada en las cepas comunitarias (151).
- Los factores de riesgo de los enfermos son distintos, puesto que los pacientes que se encuentran ingresados se caracterizan por la instrumentalización, los procedimientos agresivos y por ser pluripatológicos. Todo ello explica que la mortalidad sea significativamente mayor (152).
- La mayor aparición de cepas multirresistentes. En la actualidad, *Klebsiella* spp. con sensibilidad reducida a carbapenémicos supone el 41% de los aislamientos hospitalarios de este grupo de enterobacterias en España (153).

En los brotes nosocomiales causados por *K. pneumoniae* son de especial importancia los producidos por cepas resistentes a los antimicrobianos habituales. Ya en la década de los setenta se describen brotes producidos por cepas con determinantes de resistencia frente a aminoglucósidos (154,155). A partir de 1982 se describen brotes por *K. pneumoniae* resistentes a antimicrobianos β -lactámicos, incluyendo cefalosporinas, mediante la producción de enzimas BLEE (156,157), que han conseguido diseminarse mundialmente a lo largo de las décadas posteriores (158).

A esta situación se le ha unido en los últimos años la diseminación de cepas productoras de β -lactamasas con actividad frente a antimicrobianos carbapenémicos, que han convertido a los brotes nosocomiales por *K. pneumoniae* multirresistente a antimicrobianos en una emergencia sanitaria internacional (159).

Un aspecto importante con respecto a estos brotes nosocomiales son los clones conocidos como “de alto riesgo” que han conseguido diseminarse rápidamente a nivel mundial en pocos

años. Se definen como poblaciones altamente especializadas, con elevada capacidad para colonizar, diseminarse y persistir en nichos específicos tras haber adquirido características adaptativas que aumentan su epidemividad y/o potencial patógeno, incluyendo la resistencia antibiótica (160).

Un ejemplo es el clon ST258 de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa, que actualmente se considera endémico en Estados Unidos, Israel, Grecia, Italia, Polonia y Colombia. Otros clones considerados de alto riesgo son ST11, ST101, ST15 y ST437 (161).

Para controlar la diseminación de cepas resistentes en el ambiente hospitalario, es necesario cumplir adecuadamente con una serie de medidas de control de la infección, entre las que destacan: la rápida identificación del brote, una estricta higiene y el seguimiento de los protocolos hospitalarios que previenen la transmisión de la cepa entre distintos pacientes mediante fómites o por la actividad del personal sanitario. La utilización de medidas de barrera en la manipulación de los pacientes colonizados o infectados con alguna cepa de *K. pneumoniae* multirresistente, así como el uso de material fungible de un solo uso, son medidas de control que pueden ayudar a minimizar la transmisión de las cepas multirresistentes circulantes (22,149).

El tratamiento de estas infecciones debe ser individualizado, valorándose la sensibilidad de la bacteria a los antimicrobianos, el lugar de la infección y la gravedad del paciente. También es muy importante conocer la epidemiología de cada centro a la hora de instaurar un tratamiento empírico ante la sospecha de una infección por *K. pneumoniae* multirresistente.

Entre los agentes bacterianos más activos frente a *K. pneumoniae* multirresistente se encuentra la colistina, la tigeciclina, la fosfomicina y los aminoglucósidos, aunque se está observando que las resistencias a estos fármacos de última línea están en aumento (162). No obstante, en los últimos años han aparecido en el mercado nuevos fármacos aprobados para estos MMR, como el ceftolozano-tazobactam, la ceftazidima-avibactam, el meropenem-varbobactam, el cefiderocol, la plazomicina y la eravaciclina. En la **figura 1.15**, aparece el esquema de la optimización del tratamiento para MMR.

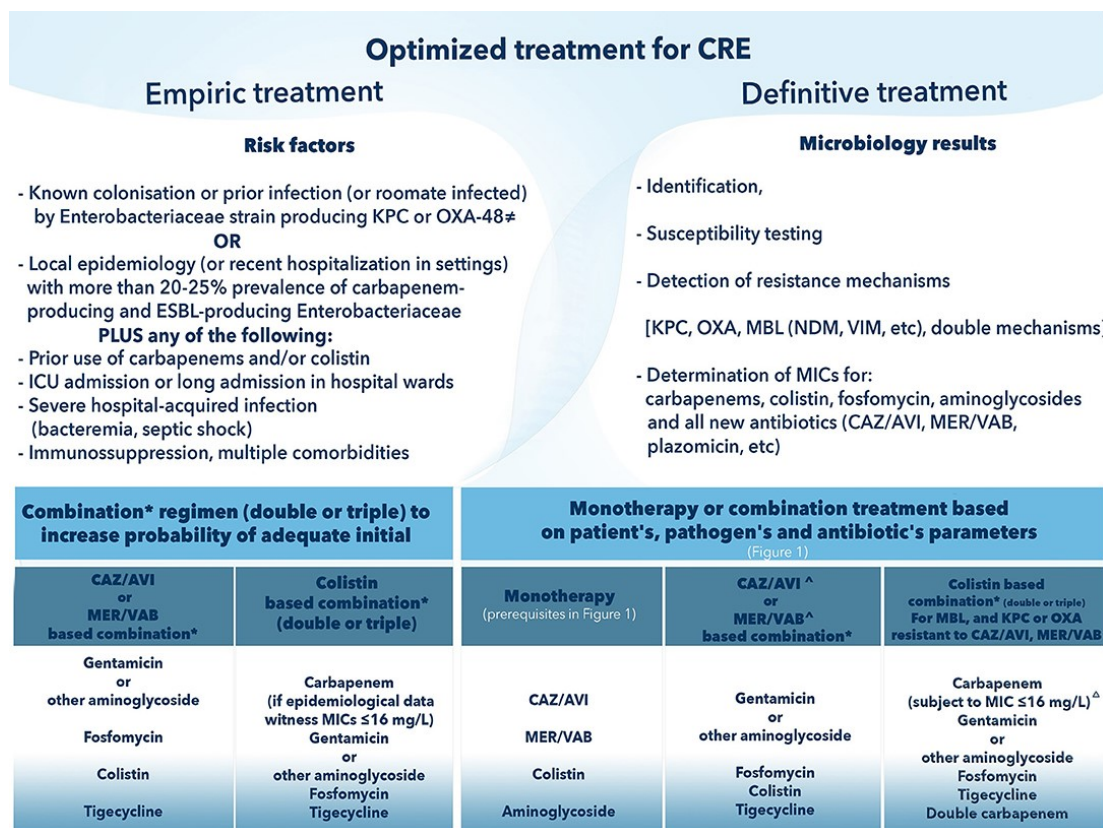


Figura 1.15. Optimización del tratamiento para MMR (163)

Para la instauración del tratamiento empírico se deben considerar factores de riesgo como la colonización o infección previa por MMR, así como la epidemiología local. Además, también debe tenerse en cuenta el uso previo de carbapenems y/o colistina, la estancia en UCI o ingreso hospitalario de larga duración, así como el estado de inmunodepresión o comorbilidades.

En cuanto al tratamiento definitivo, se ajusta según antibiograma, concentración mínima inhibitoria (CMI) y mecanismos de resistencia detectados.

En general, la terapia combinada se recomienda para infecciones graves por *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas.

II. Justificación y objetivos



Justificación

La rápida expansión de la resistencia a antibióticos carbapenémicos en *K. pneumoniae*, considerados antimicrobianos de última línea, se atribuye a la adquisición de enzimas con capacidad para hidrolizar estos antibióticos. Además, esta diseminación se ve facilitada por la existencia de elementos genéticos móviles que pueden transferirse de forma horizontal dentro de la misma especie. Por este motivo, tras la creciente alarma por el aumento de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems y sus preocupantes consecuencias para la Salud Pública decidimos realizar un estudio en nuestro área para caracterizar las cepas de *K. pneumoniae* en las que se detectara resistencia a dichos antimicrobianos.

Por otro lado, con el desarrollo de las nuevas tecnologías de secuenciación genómica y su reciente aplicación a la Microbiología Clínica, se está obteniendo información precisa sobre los genes relacionados con la resistencia antimicrobiana, así como sobre los elementos genéticos móviles en los que se encuentran dichos genes.

Además, también pueden identificarse genes de virulencia y llevarse a cabo estudios epidemiológicos para la caracterización de brotes. Esta novedosa técnica se ha utilizado en esta tesis doctoral para obtener una comprensión más profunda de las características genéticas de los microorganismos estudiados, así como realizar una comparación con los métodos “clásicos” hasta ahora disponibles en los laboratorios de Microbiología Clínica.



Objetivos

Objetivo principal

Caracterizar las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems aisladas durante los años 2015-2018 en el Consorcio Hospital General Universitario de Valencia.

Objetivos secundarios

1. Descripción de las características clínico-demográficas de los pacientes con aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems y análisis de posibles factores de riesgo relacionados con dichos aislamientos.
2. Estudio del perfil de sensibilidad de las cepas y caracterización fenotípica y genotípica de mecanismos de resistencia antibiótica.
3. Análisis de elementos genéticos móviles relacionados con la diseminación de resistencias.
4. Determinación de factores de virulencia.
5. Análisis e investigación de brotes nosocomiales.

III. Material y métodos

1. Pacientes y origen de los aislados de *Klebsiella pneumoniae*

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo desde enero del año 2015 hasta diciembre del año 2018, ambos inclusive, en el Servicio de Microbiología del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV), incluyendo todas las cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenems (KPRC). El CHGUV es un hospital terciario con una población de referencia cercana a los 360.000 habitantes, con 503 camas de hospitalización, 27 quirófanos y 190 consultas externas.

1.1. Pacientes

Se recopilaron datos clínicos y demográficos de los pacientes infectados y/o colonizados por KPRC a partir del sistema informático del laboratorio (GestLab) y de las historias clínicas electrónicas consultando el programa Hospital General Intranet. Todos los datos se registraron en una base de datos Excel para su posterior estudio y análisis estadístico. El único criterio de inclusión para el estudio fue el aislamiento de KPRC.

Los datos recogidos de cada paciente fueron los siguientes:

- Sala de hospitalización (únicamente el episodio en el que se aísla la KPRC incluida en el estudio)
- Hospitalización previa (< 6 meses)
- Tipo de infección (en caso de producirse)
 - Asociada a la asistencia sanitaria (IRAS): aparición de la infección tras al menos 48 horas de hospitalización o durante los 30 días posteriores a la asistencia sanitaria (164).
 - Infección adquirida en la comunidad: aparición de la infección durante las 48 primeras horas de hospitalización y sin haber tenido contacto previo con la asistencia sanitaria (165).
- Antibioterapia reciente (< 30 días)
- Comorbilidades
 - *Diabetes mellitus*

- Insuficiencia renal crónica
- Cirrosis
- Enfermedad pulmonar crónica
- Uropatología funcional o estructural
- Catéter urinario
- Colonización previa (faríngea o axilo-rectal)
- Complicaciones durante la hospitalización
 - Sepsis
 - Neumonía (asociada o no a ventilación mecánica)
 - Cirugía o complicaciones derivadas de la misma (< 30 días)

En el **Anexo I** se encuentra la hoja de recogida de datos que se utilizó para el estudio.

Para el análisis estadístico, se realizó un análisis univariado de todas las variables: (factores de riesgo) para desarrollar infección y/o colonización por KPRC. Se calcularon los Odds ratio (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95% utilizando el software en línea MedCalc (166).

1.2. Aislados

En este estudio se incluyó únicamente una cepa de KPRC por paciente, habitualmente el primer aislamiento, excepto en aquellos casos en los que dicha cepa no se encontrara disponible.

Aunque el procedimiento será detallado a continuación, la **figura 2.1** muestra un esquema general de la metodología seguida para todos los aislados estudiados en esta tesis.

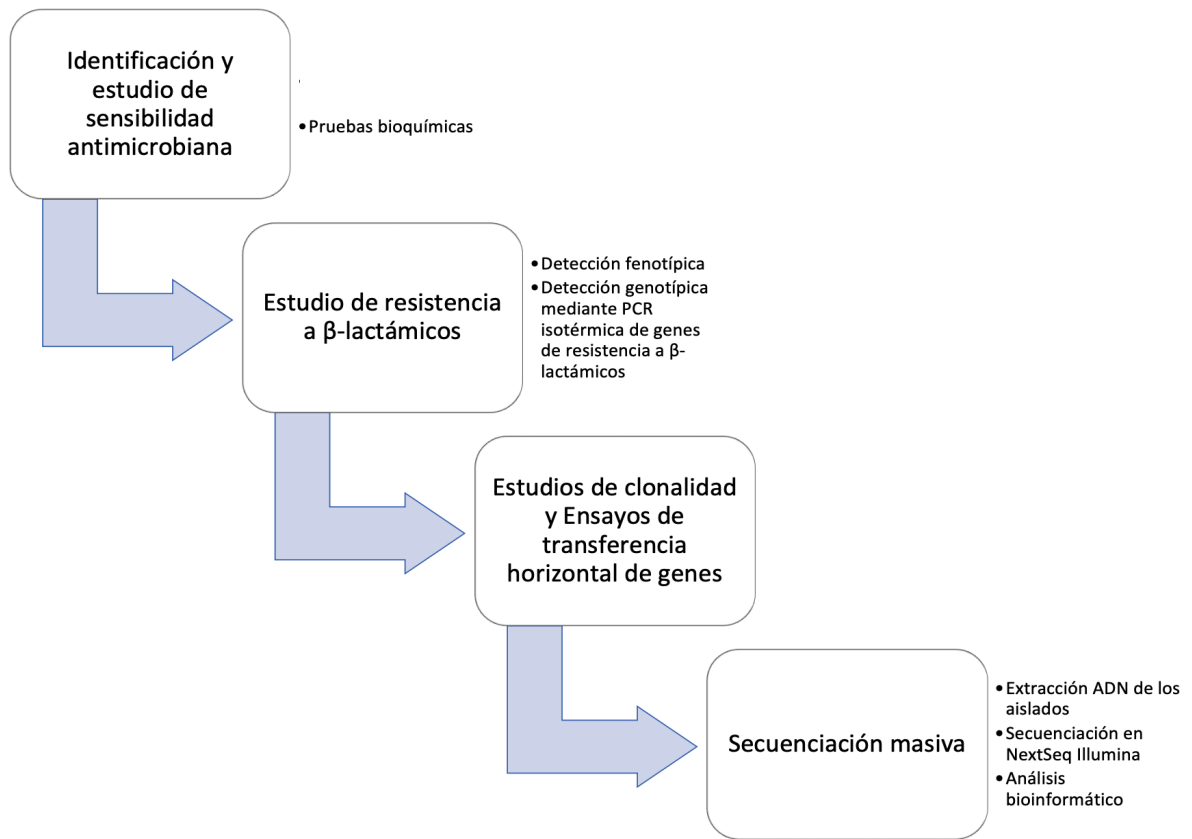


Figura 2.1. Esquema general de la metodología para el estudio y caracterización de las cepas de KPRC

2. Identificación y estudio de sensibilidad a antimicrobianos. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia a carbapenémicos

2.1. Identificación y estudio de sensibilidad a antimicrobianos

Los aislamientos de *K. pneumoniae* procedentes de muestras clínicas y/o muestras de vigilancia activa durante los años 2015 a 2018 se identificaron mediante pruebas bioquímicas con el método automatizado MicroScan® (Beckman Coulter) con los paneles NUC69 y NC70, en función del tipo de muestra (NUC69 orinas y NC70 resto de muestras). Este método combina diferentes pruebas bioquímicas y enzimáticas para la identificación de los microorganismos, junto con concentraciones críticas de antibióticos para determinar la concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$) (CMI) de los distintos antibióticos frente a los microorganismos. La CMI por el método de microdilución se define como la menor concentración capaz de inhibir el crecimiento visible de bacterias, cuando se utiliza un inóculo de 10^5 unidades formadoras de colonias/ml (ufc/ml).

Los antibióticos incluidos en estos paneles son los siguientes: ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, piperacilina, ticarcilina, piperacilina/tazobactam, cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima, aztreonam, cefepime, imipenem, ertapenem, meropenem, tigeciclina, fosfomicina, colistina, gentamicina, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino y cotrimoxazol. En la **tabla 2.1.** se detallan los antimicrobianos analizados y los rangos de diluciones en los paneles MicroScan.

Tabla 2.1. Antimicrobianos analizados y rango de diluciones en los paneles MicroScan

Antimicrobianos	Rango de diluciones ($\mu\text{g/ml}$) (Panel NUC69)	Rango de diluciones ($\mu\text{g/ml}$) (Panel NC70)
Amikacina	8-16	8-32
Amoxicilina/ác.clavulánico	4/2-16/8	8/4-16/8
Ampicilina	8-16	8-16
Aztreonam	-	-
Cefepime	-	1, 4-16
Cefotaxima	1-16	1-16
Cefotaxima/CA	0.5/4-1/4,4/4	0.5/4-1/4,4/4
Cefoxitina	8-16	8-16
Ceftazidima	1-16	1-8
Ceftazidima/CA	0.25/4-0.5/4,2/4	0.25/4-0.5/4,2/4
Cefuroxima	8-16	8-16
Ciprofloxacino	0.5-2	0.5-2
Ertapenem	0.5-1	0.5-1
Fosfomicina	32-64	-
Gentamicina	2-8	2-8
Imipenem	1-8	1-8
Levofloxacino	1-4	1-4
Ácido nalidíxico	16	-
Nitrofurantoína	32-64	-
Norfloxacino	0.5-1	-
Piperacilina/tazobactam	8/4-16/4,64/4	8/4-16/4,64/4
Tigeciclina	-	1-2
Tobramicina	2-8	2-8
Trimetoprim/Sulfametoxazol	2/38-4/76	2/38-4/76

Se dispensaron 0,1 ml de una dilución a concentración conocida de microorganismo a partir de colonias crecidas en medio de cultivo sólido en cada pocillo de una placa con diferentes concentraciones de los diversos antibióticos deshidratados (en forma de diluciones seriadas) mediante un sistema de inoculación (Prompt™) que consta de botellas con agua para inóculo de

30 ml con PLURONICr y un sistema para coger la colonia, así como un sistema RENOKr para dispensar el volumen necesario en los paneles. En la **figura 2.2** aparece un panel de microdilución en caldo NUC69 (Beckman Coulter®) utilizado para el estudio de identificación y sensibilidad antibiótica de las cepas estudiadas.

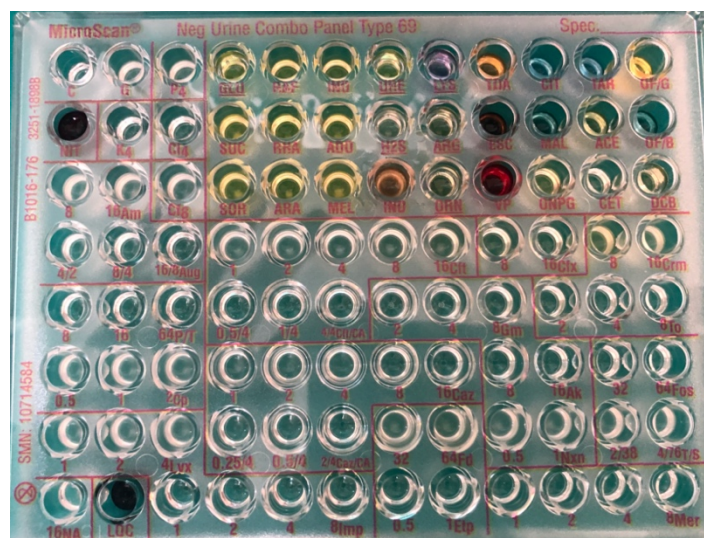


Figura 2.2. Panel de microdilución en caldo NUC69 (Beckman Coulter®)

Tras la inoculación de una suspensión estandarizada de la bacteria problema, los paneles se introdujeron en el instrumento WalkAway, donde se incubaron a 35°C durante un tiempo que depende del tipo de panel, del microorganismo y de los resultados del procesamiento. La lectura de los paneles se realizó de forma automática por el equipo tras un mínimo de incubación 16-20 horas.

Para la interpretación categórica de sensibilidad antibiótica se siguieron los puntos de corte publicados por el CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*) (167) de cada año correspondiente. En el caso de la tigeciclina, se utilizaron los puntos de corte publicados por EUCAST (*European Committee on antimicrobial susceptibility testing*) (168) para *Escherichia coli*. En el caso de la fosfomicina, se utilizaron los puntos de corte publicados por el CLSI para *Escherichia coli*.

Tras la interpretación previamente mencionada, se clasificaron los microorganismos del estudio en multirresistentes (MDR), extremadamente resistentes (XDR) o panresistentes (PDR), según la clasificación de Magiorakos *et. al* (169).

2.1.1. Método Epsilométrico

Es un método de difusión cuantitativo que utiliza tiras comerciales impregnadas con concentraciones crecientes de antibiótico, que permite conocer la CMI exacta del microorganismo por difusión. La tira tiene, además de las concentraciones seriadas dobles que se utilizan convencionalmente, concentraciones intermedias. Se utilizó un inóculo ajustado a 0,5 de la escala McFarland ($\approx 10^8$ ufc/ml), se sembró en una placa de agar Mueller-Hinton (BD) y se colocaron las diferentes tiras de gradiente (Liofilchem®). La lectura se realizó tras incubar la placa en atmósfera aerobia durante 18 horas a 37°C. La CMI se leyó en el punto de intersección del halo de inhibición con la tira y los resultados se interpretaron según los puntos de corte de sensibilidad y resistencia de CLSI.

Este método se utilizó para realizar comprobaciones en las CMIs de algunos antimicrobianos (**figura 2.3**) o para el ensayo de ATBs no incluidos en los paneles MS, como es el caso de la fosfomicina, que está en los paneles NUC69 pero no en los paneles NC70.

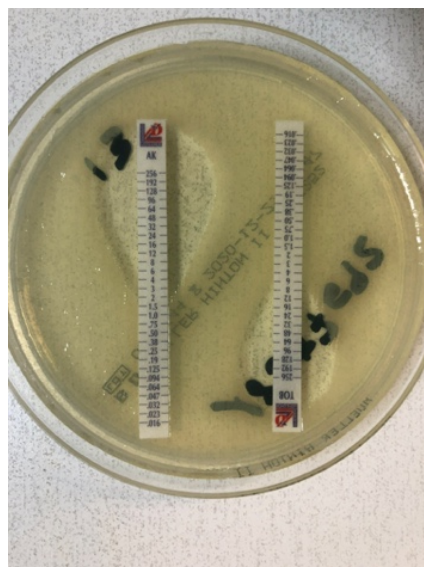


Figura 2.3. Determinación de CMI por el método epsilométrico

2.2. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia a carbapenems

2.2.1. Test bioquímico: β -Carbatest (BioRad)

β -Carbatest (BioRad) es un test colorimétrico cualitativo basado en la detección de la hidrólisis del anillo β -lactámico del imipenem.

El test se realizó a todas las cepas incluidas en el estudio, en microtubos a partir de colonias frescas de *K. pneumoniae* crecidas en agar sangre. Se observó un cambio de color (de amarillo a rojo o naranja) de la solución en los casos en los que había producción de carbapenemasas. La interpretación del resultado se realizó tras 30 minutos de incubación a 37°C, según las indicaciones del fabricante.

En la **figura 2.4.** se muestra gráficamente el procedimiento para la realización del test y en la **tabla 2.2.** se especifica la interpretación de los resultados.

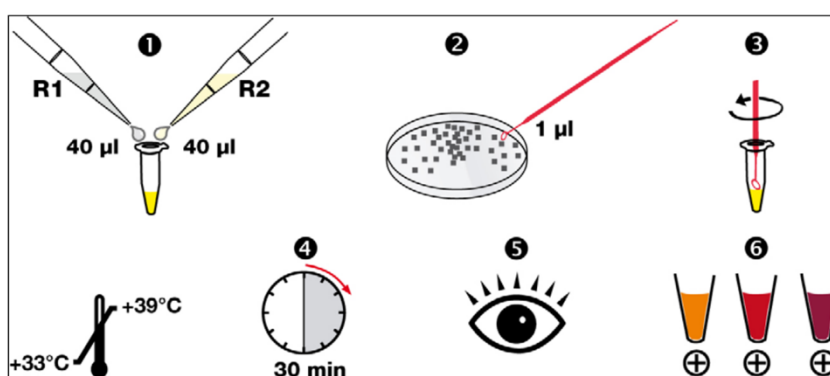


Figura 2.4. Procedimiento para la realización del β -Carbatest (BioRad). Fuente: Insert de BioRad, versión 2015/05

Tabla 2.2. Interpretación de los resultados del β -Carbatest (BioRad) tras incubación 30 minutos a 37°C

	Resultado	Interpretación
Cambio de color de amarillo a naranja claro, rojo o morado	Positivo	Presencia de producción de carbapenemasas
Sin cambio de color. Se mantiene el color amarillo inicial	Negativo	Ausencia de producción de carbapenemasas

2.2.2. Determinación de la inhibición de la hidrólisis de carbapenems por distintos compuestos

La determinación de la hidrólisis de carbapenems se realizó mediante el estudio de la sinergia de discos de carbapenémicos combinados con inhibidores (ROSCO Diagnostica). Se realizó una dilución 0.5 McFarland y se sembró en placas de agar Müeller-Hinton, incubándolas a 37°C durante 18-24 horas. En la **figura 2.5.** se observa el efecto de sinergia cuando se combina el carbapenémico (meropenem, MR 10) con inhibidores: meropenem con ácido fenilborónico (MR+BO) para la detección de carbapenemasas tipo KPC; meropenem con ácido dipicolínico (MR+DP) para la detección de carbapenemasas tipo B o metalo- β -lactamasas (NDM, VIM) y meropenem con cloxacilina (MR+CL) para la detección de AmpC. Además, también se añade un disco de temocilina para la detección de la producción de carbapenemasa de clase D OXA-48.

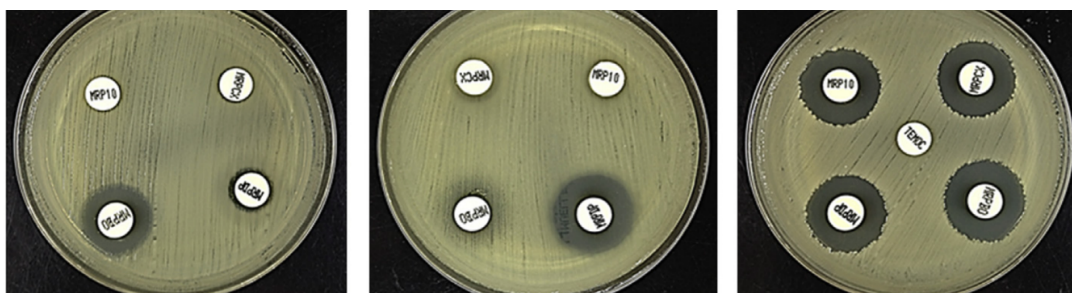


Figura 2.5. A) Inhibición con meropenem+ácido fenilborónico: detección de carbapenemasas de clase A (KPC). B) Inhibición con meropenem+ácido dipicolínico: detección de carbapenemasas de clase B (metalo- β -lactamasas: NDM, VIM...). C) Resistencia a temocilina: detección de carbapenemasas de clase D (OXA-48) (170)

3. Caracterización genotípica de mecanismos de resistencia a carbapenems y otros β -lactámicos

La caracterización de las BLEE, AmpC y carbapenemasas en los aislamientos de *K. pneumoniae* se realizó mediante la detección de los genes que codifican dichas resistencias por PCR isotérmica en el sistema comercial Eazyplex (Amplex Biosystems GmbH, Giessen, Germany) utilizando los kits Eazyplex® Superbug CRE system y Eazyplex® AmpC. Esta prueba se realizó a todas las cepas incluidas en el estudio. En la tabla 2.3 aparecen todos los genes diana detectados con los kits utilizado.

Tabla 2.3. Genes de resistencia detectados mediante PCR isotérmica

Gen resistencia	Tipo β -lactamasa	Kit utilizado
<i>bla</i> CTX-M-1 grupo	BLEE	SuperBug CRE KIT
<i>bla</i> CTX-M-9 grupo	BLEE	SuperBug CRE KIT
<i>bla</i> CMY-II (-1/8/9/10/11/19)	AmpC	SuperBug AmpC
<i>bla</i> MOX (-1/2/3/4/8/10/11)	AmpC	SuperBug AmpC
<i>bla</i> ACC (-1-6)	AmpC	SuperBug AmpC
<i>bla</i> DHA (-1-24)	AmpC	SuperBug AmpC
<i>bla</i> KPC (-2-15)	Carbapenemasa	SuperBug CRE KIT
<i>bla</i> NDM (-1-7)	Carbapenemasa	SuperBug CRE KIT
<i>bla</i> OXA-48 (OXA-48, -162, -204, -244)	Carbapenemasa	SuperBug CRE KIT
<i>bla</i> VIM (-1-37)	Carbapenemasa	SuperBug CRE KIT
<i>bla</i> OXA-181(-181, -232)	Carbapenemasa	SuperBug CRE KIT

4. Detección del fenotipo de hipermucoviscosidad: “Test de String”

Para determinar si se la cepa con se consideraba fenotipo hipermucovisco se realizó el “test de String” a todas las cepas incluidas en el estudio. Se llevó a cabo de la siguiente manera: con un asa de 1µl se tocó una colonia crecida en agar sangre tras 18 horas de incubación a 37°C. Posteriormente, se realizó un movimiento hacia arriba en sentido perpendicular a la placa. Se consideran cepas con fenotipo hipermucoviscoso aquellas que levantan un filamento (o “cuerda” del inglés “string”) de más de 5 mm de longitud (**figura 2.6**).



Figura 2.6. “Test de *String*” positivo (171)

5. Estudios de clonalidad: análisis del patrón de macrorrestricción del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE)

El análisis del patrón de macrorrestricción del ADN cromosómico mediante electroforesis en campo pulsado se utiliza para realizar estudios de clonalidad. Hasta la fecha se ha considerado el método de referencia ya que posee un elevado poder de discriminación y una excelente reproducibilidad. El principal inconveniente de esta técnica de tipificación molecular es que es muy laboriosa y larga, ya que la mayoría de los protocolos requieren más de 4 días para poder obtener y analizar los patrones de bandas. Consiste en tipificar molecularmente las cepas de *K. pneumoniae* para estudiar la relación epidemiológica existente entre ellas. En nuestro caso, la realización de esta técnica nos permitió conocer si las cepas circulantes de *K. pneumoniae* en una misma área pertenecían a un único clon o a varios clones distintos.

Todas las cepas se tipificaron mediante PFGE-RFLP en el CHEF-DR II (Bio-Rad) utilizando una endonucleasa de baja frecuencia de corte (*Xba*I), siguiendo el protocolo descrito por Han *et. al* (172).

5.1. Extracción del ADN cromosómico

Se realizó una suspensión bacteriana en 5 ml de tampón SE a partir colonias de KPRC crecidas en medio agar Müeller-Hinton (BD). A continuación, se centrifugó (3500rpm, 10 min) y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió con 3 ml de tampón SE (NaCl 75 mM, pH 8; EDTA 5mM). Posteriormente, se ajustó la concentración celular bacteriana mediante el estándar de turbidez de Mcfarland entre 2.5 y 3, en 5 ml de tampón SE (NaCl 75 mM, pH 8; EDTA 5mM).

Para elaborar los bloques de agarosa se tomó 1 ml de la solución celular bacteriana ajustada a un tubo eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min.

A continuación, se retiró el sobrenadante con pipeta y se resuspendió con 300 µl de tampón TE (Tris 10 mM + EDTA 0.1 mM). Se agitó y se mezcló a partes iguales con agarosa de bajo punto de fusión al 2% (BioRad) en el mismo tampón TE y se rellenaron los moldes de los bloques.

Una vez gelificados los bloques, se realizó la lisis celular. Para ello se incubaron a 55°C durante al menos 5 horas en 3 ml de una solución de lisis (Tris 50 mM, pH 8.0; EDTA 50 mM; 1% Sarcosina; 1 mg/ml proteinasa K). Con el fin de eliminar posibles interferencias tras el proceso de lisis celular, se realizaron 4 lavados de los bloques a temperatura ambiente con 3 ml de tampón de lavado (Tris 10 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM) con un intervalo de 45-60 minutos entre ellos.

5.2. Digestión del ADN y electroforesis en campo pulsado (PFGE)

Para la digestión del ADN se utilizaron 50 unidades de la enzima de restricción *Xba*I (Thermo Scientific™), enzima de baja frecuencia de corte que reconoce los sitios T[^]CTAGA a una temperatura de incubación 37°C, según las condiciones establecidas por el fabricante. La electroforesis se realizó utilizando el sistema CHEF-DR II (Bio-Rad) (**Figura 2.7**). Se utilizaron geles de agarosa (Invitrogen™) al 1% en tampón 0,5X TBE (NZYTECH) (Tris 50 mM; 50 mM ácido bórico; 0,2 mM EDTA, pH 8,5).



Figura 2.7. Sistema CHEF-DR II (BioRad)

La electroforesis se llevó a cabo en 0,5X TBE durante 22 horas a 14°C. Los pulsos fueron distribuidos linealmente de 2.2 a 54.2 segundos, con un voltaje mantenido de 6v/cm² y un ángulo de 120°.

5.3. Análisis del patrón de macrorrestricción del ADN cromosómico

Los geles se tiñeron con SYBRsafe Green (Invitrogen) durante media hora y se visualizaron con la ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta (UV).

La interpretación de los patrones de bandas se hizo siguiendo criterios preestablecidos por Tenover (118). Tras el análisis visual, se consideraron clones idénticos aquellos que presentaron las mismas bandas, clones genéticamente relacionados aquellos que presentaron una diferencia de 3 o menos bandas y clones distintos cuando la diferencia fue de más de 3 bandas. Además, la comparación de los patrones de bandas también se realizó mediante el programa informático Bionumerics v7.6 (Applied Maths) (173). La relación se calculó mediante el método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages*), que utiliza medias ponderadas según el número de elementos que hay en cada conglomerado. La similitud de bandas se determinó con el coeficiente DICE, que compara la similitud de dos muestras, con un valor de optimización del 1% y una tolerancia del 1.5%.

Se asignó a cada clon distinto una letra del abecedario correlativa: A, B, C... etc. Cuando se trató de subtipos genéticamente relacionados se le asignó un número a la letra correspondiente: A1, A2, etc.

6. Ensayos de transferencia horizontal de genes de resistencia

Se llevaron a cabo experimentos de transferencia horizontal de material genético, adaptando el protocolo descrito por Möller *et al.* (174) con el fin de demostrar la capacidad de diseminación de las carbapenemasas detectadas en las cepas de *K. pneumoniae*. Se seleccionaron dos cepas donantes: una productora de *bla*_{OXA-48} y otra productora de *bla*_{NDM-1}. El ensayo se realizó en medio líquido, utilizando la cepa de *Escherichia coli* J53 (resistente a azida sódica) como cepa receptora (175). Las colonias crecidas en los medios de cultivo selectivos para el experimento (agar con ertapenem 0.5 µg/ml y azida sódica 100 µg/ml) fueron identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF, y el estudio de sensibilidad antibiótica se realizó de forma manual con discos de antibiótico (BD) de amoxicilina-clavulánico (20/10 µg), ertapenem (10 µg), meropenem (10 µg), ciprofloxacino (5µg) y gentamicina (10 µg), para comprobar que únicamente los genes de resistencia vehiculizados en plásmidos se encontraban en la cepa receptora. En el caso de haberse realizado la transferencia horizontal con éxito, únicamente encontraríamos en la cepa receptora las resistencias antibióticas vehiculizadas en plásmidos (β-lactámicos principalmente y en función del plásmido también resistencia a otras familias de antibióticos como los aminoglucósidos) y no las cromosómicas (quinolonas). Posteriormente, se realizó el antibiograma completo mediante microdilución en caldo utilizando el sistema MicroScan (Beckman Coulter) para obtener las CMIs de los antimicrobianos necesarios.

7. Secuenciación masiva

La secuenciación masiva de las cepas incluidas en esta tesis doctoral se realizó en el departamento de Genómica y Salud de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO). Las etapas siguientes, que comprenden tanto el procesamiento de las lecturas como su análisis bioinformático, fue trabajo de esta tesis doctoral realizado durante una estancia en dicho departamento. En la **figura 2.8** aparece el esquema de los principales procesos.

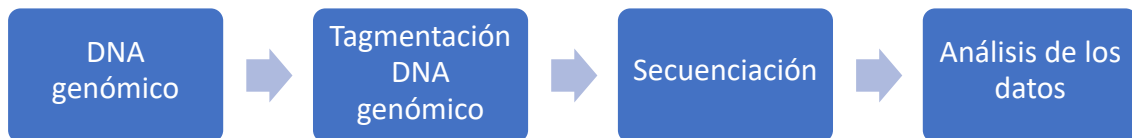


Figura 2.8. Esquema de los principales procesos en la secuenciación masiva

7.1. Extracción del ADN mediante métodos automatizados

La extracción del ADN de todos los aislados se realizó en el Servicio de Microbiología del CHGUV a partir de cultivos de 18-24 horas de incubación en Müller-Hinton Agar (BD) mediante el método automatizado MagCore Automated Nucleic Acid Extractor (RBC BioScience). Se obtuvieron 100 µl de ADN de cada aislado y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento en FISABIO.

Previo a la secuenciación, se realizó la comprobación de la calidad del ADN genómico, así como su cuantificación con Qubit utilizando el dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen™). El kit proporciona soluciones para el reactivo de ensayo concentrado, el tampón de dilución y las seroalbúminas bovinas (DNA) prediluidas. Este método parte de 1 µl de muestra al que se añade una mezcla de tampón de dilución y el reactivo específico para la cuantificación de ADN de doble cadena en un volumen final de 200 µl. Una vez determinada la concentración de cada muestra, se realizaron alícuotas de 5 µl a 0,2 ng/µl que se emplearon para la secuenciación.

7.2. Secuenciación masiva

La secuenciación masiva se realizó en un sistema Illumina NextSeq 500 utilizando kits Nextera XT, DNA library preparation kit para la preparación de la librería y el Illumina Reagent kit v3.

La confección de la librería comienza por el ADN genómico, que se fragmenta posteriormente. Los fragmentos de ADN con extremos romos se generaron mediante una combinación de reacciones de relleno y la actividad de la exonucleasa, mientras que el tamaño se seleccionó con las bolas de purificación de muestras suministradas. A los extremos romos se añadió a continuación una base A, que los preparó para la ligadura a los adaptadores indexados. Los adaptadores son fragmentos de ADN de doble cadena con secuencias consenso donde se alinean los cebadores para las etapas de amplificación. Tras la amplificación, se obtienen lecturas emparejadas de 150 bases de longitud (2x150pb).

7.3. Análisis de las secuencias obtenidas

El flujo de trabajo que se siguió comprende 3 grandes bloques:

- Preprocesamiento de las secuencias: calidad y filtrado.
- Tipado de las cepas, detección e identificación de genes de resistencia, plásmidos y factores de virulencia.
- Reconstrucción del genoma: ensamblaje por mapeo y ensamblaje *de novo*, anotación de genes y plásmidos, estudio de mutaciones en porinas.

7.3.1. Preprocesamiento de las lecturas

7.3.1.1. Calidad de las secuencias

Los secuenciadores generan cantidades masivas de datos, que son los llamados ficheros crudos en formato fastq. Cada fichero fastq puede incluir millones de secuencias para una sola muestra o aislado. Este fichero fastq contiene las secuencias de nucleótidos y las calidades con la que se ha leído cada una de las posiciones de cada secuencia. Esta calidad se codifica en una escala logarítmica denominada escala PHRED (176). Para el estudio de la calidad se utilizaron las herramientas FastQC (129) y MultiQC (177). El programa FastQC permite analizar la calidad de la secuencia generada por plataformas de NGS calculando el índice de calidad (score) tanto de las secuencias individuales como de cada posición de la secuencia. Esto permitió filtrar las secuencias por calidad y decidir si se utiliza la secuencia completa o si, por ejemplo, se elimina los extremos si la calidad en estos disminuye, algo que resulta bastante común en este tipo de secuenciación. Por otro lado, también realiza un análisis de la presencia de posibles secuencias cortas que se encuentran altamente representadas en el experimento y que suelen estar generadas por errores en el proceso de secuenciación o por productos de amplificación y que hay que eliminar.

Así pues, una vez obtenidas las secuencias en crudo, se realizó un control general de los millones de lecturas que se encuentran en cada archivo fastq, obteniendo gráficos considerando la

calidad por posición de las lecturas, el contenido de cada nucleótido por posición, el contenido GC por posición, el contenido de indeterminaciones (Ns) por posición, la distribución de la longitud de las secuencias, la presencia de duplicados en las secuencias, etc.

Esta información es la que permitió decidir qué filtros de calidad utilizar para eliminar aquellas lecturas que posiblemente sean un producto de un error en el experimento para así mantener únicamente las lecturas con buena calidad que representan la muestra.

7.3.1.2. Refinamiento de las lecturas

En este paso se filtraron, es decir, se eliminaron, las bases de baja calidad, llegando incluso a eliminar lecturas completas que en su totalidad no se consideraron aceptables. Este paso es necesario para evitar complicaciones y errores al reconstruir el genoma, ya que las lecturas y bases de baja calidad pueden interferir tanto al alinear las lecturas frente al genoma de referencia como al realizar un ensamblado *de novo*. La herramienta que se utilizó fue Prinseq (130). Los parámetros se establecieron para eliminar todas aquellas lecturas con una longitud menor de 100 pb y para cortar 10 pb en el extremo 5' de las lecturas, donde se detectó peor calidad por restos de adaptadores. En la zona derecha se eliminaron los nucleótidos con calidades medias inferiores a 28. Por último, se hizo un cálculo de las estadísticas y comprobación de la mejora de las lecturas con FastQC y MultiQC.

A partir de este momento, se comenzó a trabajar con las lecturas. Como el método seguido para la secuenciación produce lecturas emparejadas, se obtuvieron dos archivos fastq por cada muestra, fastq1 y fastq2. A partir de los 2 archivos fastq obtenidos para cada muestra se pudo, por un lado, realizar la detección e identificación de genes de resistencia, plásmidos, factores de virulencia y tipado de las cepas, y por otro, realizar el ensamblaje y la anotación genómica. Todos estos procesos se desarrollarán más adelante en su apartado correspondiente.

7.3.2. Tipado de las cepas, detección e identificación de genes de resistencia, factores de virulencia y plásmidos

7.3.2.1. Tipado de las cepas

El tipado de cada cepa mediante la caracterización de secuencias de varios loci o “*Multi-locus Sequence Typing*” (MLST) se realizó utilizando el programa ARIBA a partir de las lecturas obtenidas de la secuenciación masiva, utilizando una función que se conoce como “*MLST-calling*”. En este caso se utilizó una base de datos descargada de pubmlst que contiene las secuencias de todas las variantes de los 7 genes que componen el esquema de tipado de *K. pneumoniae* (178), además de un fichero que recoge qué combinación de alelos de estos 7 genes corresponde a las diferentes secuencias tipo o *Sequence Types* (STs).

Los 7 genes que componen dicho esquema son los siguientes:

- *rpoB* (beta-subunidad de la ARN polimerasa)
- *gapA* (gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa)
- *mdh* (malato deshidrogenasa)
- *pgi* (fosfoglucoisomerasa)
- *phoE* (fosforina E)
- *infB* (factor de iniciación de la traducción 2)
- *tonB* (transductor de la energía periplásmica)

Al lanzar el comando, el programa muestra el alelo de esa cepa correspondiente a cada uno de los siete genes, y además proporciona el ST obtenido al combinar dichos alelos.

Comando utilizado:

```
LISTA=$(ls ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT | sed 's/KP-HG_R*//' | sed 's/1.fastq//' | sed 's/2.fastq//')

for i in $LISTA; do
echo $i;
ariba run KPdatabase/ref_db ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT/"$i"KP-HG_R1.fastq ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT/"$i"KP-HG_R2.fastq MLSTKP$i;
done
```

7.3.2.2. Detección e identificación de genes de resistencia

Para la detección de genes de resistencia a antimicrobianos presentes en cada uno de los aislados se utilizó ARIBA (Antimicrobial Resistance Identification by Assembly) (179). ARIBA es un programa que analiza directamente las lecturas en busca de genes o mutaciones puntuales previamente recogidas en una base de datos. Para la detección e identificación de los genes a partir de las bases de datos, ARIBA utiliza un método basado en el alineamiento de lecturas contra las secuencias de referencia de manera local. El algoritmo que lleva a cabo ARIBA agrupa las secuencias de referencia según su similitud utilizando CD-HIT v4.6 (180). Este programa crea grupos o clusters de secuencias utilizando un umbral de similitud. En este caso agrupa todas las secuencias de la base de datos en el mismo grupo si comparten un 90% de similitud, por ejemplo, un grupo podría ser un gen de resistencia y las secuencias contenidas en el grupo, los diferentes variantes o alelos de ese gen. Por tanto, las lecturas problema se mapearon contra todos los grupos y aquellas que mapearon frente al mismo grupo (*cluster*) de secuencias de referencia se ensamblaron con FERMI-LITE v0.1 (181). La secuencia resultante, ya fuera en uno o varios contigs, se alineó y comparó con las secuencias de dicho cluster mediante NUCMER v3.1 (programa del paquete MUMmer) (182), para elegir la referencia más cercana. A continuación, se realizó la

identificación de variantes (variant calling) por partida doble: por un lado se alineó el ensamblado respecto a la secuencia referencia y se compararon las variantes, de manera que se confirma que se ha ensamblado correctamente y se determina el grado de integridad de la secuencia resultante; y, por otra parte, se volvieron a mapear las lecturas con BOWTIE2 v2.2.6 (183) frente a la secuencia ensamblada y se extrajeron las variantes con SAMTOOLS MPILEUP (132), confirmando la presencia de los SNPs y calculando el grado de profundidad, es decir, el número de lecturas con las que se detecta un SNP o se lee una base del genoma. En la **figura 2.9** aparece un esquema del algoritmo que sigue ARIBA.

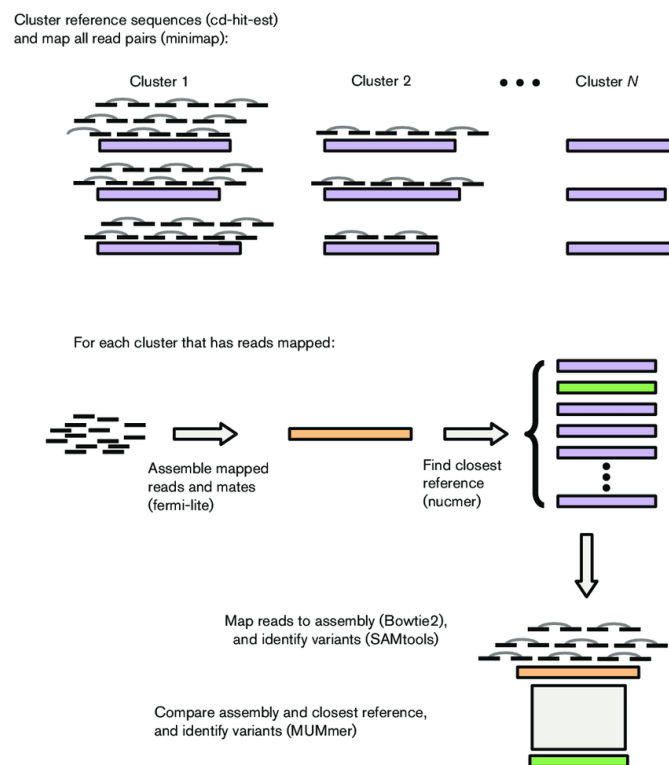


Figura 2.9. Esquema del algoritmo llevado a cabo por ARIBA (179)

ARIBA contiene distintas bases de datos con genes de resistencia: ARG-ANNOT (184), CARD (185), MEGARes (186) y ResFinder (187). Las lecturas obtenidas a partir de la secuenciación se lanzaron contra las cuatro bases de datos previamente mencionadas. Estas cuatro bases de datos se utilizan para la detección de genes de resistencia a antibióticos, pero hay ligeras diferencias entre ellas. ARG-ANNOT se utiliza para identificar nuevos determinantes de resistencia en genomas bacterianos, ResFinder sirve únicamente para detectar los genes de resistencia adquiridos de forma horizontal, es decir, no contempla los genes de resistencia antibiótica presentes en el cromosoma. CARD contiene hasta 3008 genes de resistencia, mientras que MegaRES tiene incluidas las bases de datos tanto de ResFinder como de CARD (188). Se decidió utilizar las cuatro bases de datos con el fin de obtener la mayoría de los genes de resistencia presentes posible.

Comando utilizado para la base de datos ARG-ANNOT:

```
LISTA=$(ls ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT | sed 's/ | uniq )
for i in $LISTA; do
echo $i;
ariba run ARG-ANNOT_programa/ ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT/"$i"_R1.fastq ~/ARIBA_res/
exportarSWRIGHT/"$i"_R2.fastq ARG-ANNOTKP$i;
done
```

Comando utilizado para la base de datos CARD:

```
LISTA=$(ls ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT | sed 's/ | uniq )
for i in $LISTA; do
echo $i;
ariba run CARD_programa/ ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT/"$i"_R1.fastq ~/ARIBA_res/
exportarSWRIGHT/"$i"_R2.fastq CARDGENRESKP$i;
done
```

Comando utilizado para la base de datos MEGARes:

```
LISTA=$(ls ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT | sed 's/ | uniq )  
for i in $LISTA; do  
echo $i;  
ariba run MEGARes_programa/ ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT/"$i"_R1.fastq ~/ARIBA_res/  
exportarSWRIGHT/"$i"_R2.fastq MEGAResKP$i;  
done
```

Comando utilizado para la base de datos ResFinder:

```
LISTA=$(ls ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT | sed 's/ | uniq )  
for i in $LISTA; do  
echo $i;  
ariba run ResFinder_programa/ ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT/"$i"_R1.fastq ~/ARIBA_res/  
exportarSWRIGHT/"$i"_R2.fastq ResFinderKP$i;  
done
```

Estos comandos expresan los resultados en la terminal, pero se pueden extraer posteriormente a una base de datos Excel para facilitar el análisis global.

7.3.2.3. Detección de factores de virulencia

ARIBA se utilizó también en la detección de factores de virulencia, lanzándose las lecturas contra la base de datos “*Virulence finder database*” (VFDB) (189). Entre los genes de virulencia presentes en dicha base de datos se encuentran aquellos relacionados con la adherencia, la formación de biofilms, bombas de expulsión, evasión del sistema inmune, producción de cápsula, factores nutricionales, utilización de hierro y alantoína, sistemas de excreción y resistencia al suero (20).

Comando utilizado:

```
/home/bfuster/.local/bin/ariba run VIRULENCE_programa/ 36KP-HG_R1_prinseq_good_it1s.fastq  
36KP-HG_R2_prinseq_good_P3go.fastq FVKP(cada muestra)
```

Para obtener el resumen de todas las muestras se lanzó el siguiente comando:

```
echo "resumen virulence" > viru1.txt  
LISTA=$(ls -d /home/bfuster/ARIBA_res/VIRULENCEKP*HG | sed 's/VIRULENCEKP//' | sed 's/KP-  
HG//' | sed 's/\/home\/bfuster\/ARIBA_res\/VIRULENCEKP*HG//')  
for i in $LISTA; do  
echo $i;  
vir1=$(grep "*" /home/bfuster/ARIBA_res/VIRULENCEKP"$i"KP-HG/report.tsv)  
echo "$i,$vir1" >> viru1.txt; done
```

*Insertando en este lugar cada factor de virulencia buscado.

7.3.2.4. Detección y análisis de plásmidos

ARIBA se utilizó también en la detección de plásmidos utilizando la base de datos PLASMIDFINDER. PLASMIDFINDER detecta los replicones y los clasifica de forma inmediata según

los linajes ya existentes. Además, se puede utilizar directamente a partir de lecturas crudas. Se trata de una base de datos muy completa puesto que está creada a partir de los plásmidos que se encuentran en NCBI (National Centre for Biotechnology information) (190).

Comando utilizado:

```
LISTA=$(ls ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT | sed 's/_R.*//' | uniq )
for i in $LISTA; do
echo $i;
ariba run PLASMIDS_programa/ ~/ARIBA_res/exportarSWRIGHT/"$i"_R1.fastq ~/ARIBA_res/
exportarSWRIGHT/"$i"_R2.fastq PLASMIDSKP$i;
done
```

Además de utilizar ARIBA, se realizó el análisis exhaustivo de los plásmidos mediante anotación genómica de los mismos. La anotación de genomas tras el ensamblaje *de novo* (descrito más adelante en el apartado 7.3.2.5.3) consiste en la identificación de las posiciones del genoma en las que comienza o finaliza un gen, además de la caracterización de este. La identificación de los genes reconstruidos y contenidos en los contigs se realizó con PROKKA v1.12. (191). Este programa utiliza una base de datos que contiene todas las proteínas de genomas bacterianos presentes en “Refseq” para un género específico (192), incluyendo genes ribosomales o tRNAs. Además, utiliza otros programas que permiten la predicción de genes codificantes de proteínas a las que denomina proteínas hipotéticas.

Uno de los archivos de resultados que produce PROKKA está en formato GFF3 (General format feature version 3) y contiene la información necesaria para llevar a cabo la comparación del contenido genómico: nombre, cadena en la que se encuentra, posición de inicio y fin del gen, etc.; además de la propia secuencia. Otro tipo de archivo, el FNA da información del *contig* donde se

encuentra el gen que estamos buscando, y el archivo FFN nos da la secuencia de nucleótidos de dicho gen.

En nuestro estudio, este programa se utilizó para poder realizar el estudio de los plásmidos presentes en los aislamientos de *K. pneumoniae*, con el fin de determinar qué genes de resistencia se localizaban en cada tipo de plásmido.

Como previamente se había lanzado el programa bioinformático ARIBA contra la base de datos de PlasmidFinder, se había obtenido información con respecto a los grupos de incompatibilidad plasmídica (Inc). No obstante, hasta el momento no se tenía información sobre los genes presentes en dicho plásmido detectado.

Utilizando el archivo GFF3, se localizaron tanto los genes de interés como los plásmidos. Se realizó una búsqueda utilizando BLAST, enfrentando las secuencias a la base de datos del NCBI para confirmar la presencia de cada gen de resistencia en el plásmido correspondiente.

Comandos utilizados:

```
Prokka contigs.fa
```

7.3.2.5. Reconstrucción del genoma

La secuenciación masiva produce millones de secuencias cortas (de entre 50 y 300 pb) para cada uno de los aislados. El genoma de *K. pneumoniae* está compuesto por un único cromosoma, es decir una única molécula de ADN de doble cadena, con una longitud media de 5.4 Mb. Además, puede haber un número variable de plásmidos en cada cepa, y que hay que considerar durante la reconstrucción del genoma y para entender las características fenotípicas de cada cepa. Para reconstruir el genoma original de cada una de las cepas se deben transformar los millones de lecturas cortas en una secuencia mucho más larga que represente de la forma más fiel posible lo que sería el genoma original. Para hacer esto, las dos metodologías más realizadas actualmente son 1) el alineamiento de las lecturas contra un genoma de referencia lo más cercano posible al genoma que queremos reconstruir y 2) el ensamblado *de novo* que busca el solapamiento entre

extremos de las lecturas, alargando así las lecturas cortas. Para esta tesis se utilizaron ambos métodos, el primero para comparar las cepas del estudio con un genoma de referencia y para poder obtener árboles filogenéticos, y el segundo con el fin de identificar genes de resistencia adquiridos que no aparecerían en el cromosoma de la cepa de referencia.

a) Mapeo de las lecturas contra un genoma de referencia

El primer paso para reconstruir el genoma mediante mapeo contra una referencia fue alinear todas las lecturas de una muestra frente al genoma de referencia lo más cercano posible. En este caso, se utilizó como referencia la cepa de *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae* MGH 78578. Se mapearon las lecturas utilizando el programa BWA v0.6. (Burrows-Wheeler Aligner) (193) con el algoritmo MEM, que es el óptimo para lecturas entre 70 pb y 1 Mb procedentes de secuenciación por Illumina, dada la reducción de uso de memoria del servidor utilizada con este algoritmo. Éste trata de encontrar la coincidencia exacta más larga que cubra cada posición.

Tras este paso, se obtuvieron como resultado los archivos en formato SAM (*Sequence Alignment Map*), que contiene información relevante sobre el alineamiento de las lecturas frente a la referencia, así como información extra que será útil para el post-procesamiento, como valores de calidad del mapeo de las lecturas, o de la calidad de las propias lecturas. Estos archivos ocupan mucho espacio de disco y, para conseguir un mejor manejo dado el número de muestras a procesar, se convirtieron a archivos en formato BAM, que son el formato binario de los archivos SAM, y ocupan menos espacio. Para ello se utilizó SAMTOOLS v1.9 (194), un programa que permite manipular este tipo de archivos.

Para comprobar si el mapeo se realizó correctamente o si, por el contrario, la referencia pudo no ser adecuada, se realizó el cálculo de la profundidad de cobertura con SAMTOOLS mediante la opción *depth* a partir de los archivos BAM de alineamiento de lecturas. De esta manera se calcularon el número de lecturas que se alinean en cada posición del genoma de referencia y el porcentaje de ellas que se han quedado sin mapear. Si se obtuviera un número muy bajo de profundidad de cobertura y muy alto de lecturas no mapeadas, se podría pensar que no se ha

escogido una referencia adecuada o, por ejemplo, sospechar que hay una contaminación en la muestra original.

Comando utilizado:

```
LISTA=$(ls ~/Escritorio/3_bowtie/todas/bams/sorted_bam/*sorted.bam | sed 's/\/home\/  
marcabar\/Escritorio\/3_bowtie\/todas\/bams\/sorted_bam\/\\/' | sed 's/sorted.bam//')  
  
for i in $LISTA; do  
  
echo "$i">> ~/Escritorio/3_bowtie/todas/coverage/depth_cov.txt  
  
samtools depth -a ~/Escritorio/3_bowtie/todas/bams/sorted_bam/"$i"sorted.bam | awk  
'{sum+=$3} END { print "Average = ",sum/NR}' >> ~/Escritorio/3_bowtie/todas/coverage/  
depth_cov.txt  
  
done
```


b) Identificación de variantes

La identificación de variantes comenzó a partir de los archivos BAM obtenidos tras el mapeo y utilizando SAMTOOLS v1.9. en combinación con BCFTOOLS v.1.10.

Para ello, en primer lugar, los ficheros BAM se filtraron eliminando aquellas lecturas que no hubieran mapeado o tuvieran una baja calidad de mapeo. En segundo lugar, se obtuvo un fichero de variantes (variant calling format, VCF), es decir, un archivo en el que se recoge en qué posición de las lecturas se ha encontrado un nucleótido diferente al de la secuencia referencia. Este fichero recoge también la calidad y el número de veces que se ha leído cada variante. Ambos pasos se realizaron utilizando la opción MPILEUP de SAMTOOLS.

Una vez obtenido el fichero con las variantes encontradas, se filtró para eliminar aquellas que pudieran ser debidas a errores de secuenciación u otros y mantener solo las variantes con suficiente calidad. Para ello se utilizó BCFTOOLS.

Finalmente, se utilizó el programa VCFUTILS del paquete BCFTOOLS (136) para la transformación del VCF a fastq, y SEQTK v1.3. (195) para la transformación de fastq a FASTA. Para finalizar dicho alineamiento, tuvo que incorporarse una cantidad de “N”s determinada en cada aislado, ya que es habitual que haya posiciones en el genoma que no estén recogidas en el VCF por falta de lecturas. Sin embargo, es necesario que todos los genomas mantengan la homología en todas sus posiciones. Así pues, se obtuvo un “pseudogenoma” por aislado. Estos “pseudogenomas” se concatenaron en un archivo multifasta que se corresponde con el alineamiento de todas las secuencias, puesto que cada posición se corresponde con la posición homóloga del genoma de referencia.

Por último, se comprobó que el mapeo y la detección de variantes se hubiera realizado de manera adecuada mediante la determinación de la extensión de cobertura para cada muestra, entendiendo aquí extensión de cobertura como el número de posiciones que han podido

determinarse correctamente (posiciones distintas de "N") respecto del total de bases del genoma de referencia.

Comandos utilizados:

VARIANT CALLING

Detecta todas las variantes ya sean de buena o de mala calidad

```
$SAMTOOLS mpileup -q 30 -Q 30 -uf $REFERENCE "$sample".final.bam | $BCFTOOLS call -c --ploidy 1 -O z -o "$sample"_raw.vcf.gz
```

FILTERING VCF

En este paso se seleccionaron solo aquellas variantes que pasan un filtro concreto.

```
$BCFTOOLS filter -s LowQual -g 3 -G 10 -i '%QUAL>=30 && MQ>=30 && (DP4[2]+DP4[3])>=10 && ((DP4[2]+DP4[3])/(DP4[0]+DP4[1]+DP4[2]+DP4[3]))>=0.90 || %QUAL>=30 && MQ>=30 && (DP4[0]+DP4[1])>=5 && ((DP4[0]+DP4[1])/(DP4[0]+DP4[1]+DP4[2]+DP4[3]))>=0.90' "$sample"_raw.vcf.gz -O z -o "$sample"_filter.vcf.gz
```

Se escogieron solo aquellas variantes que pasan el filtro (PASS) y eliminamos INDELS

```
$BCFTOOLS view -f "PASS" "$sample"_filter.vcf.gz | grep -v "INDEL" > "$sample"_final.vcf
```

Se convirtió el archivo .vcf con las variantes de calidad a fastq

```
$VCFUTILS vcf2fq "$sample"_final.vcf > "$sample".fastq
```

Se convirtió el fastq a fasta

```
$SEQTK seq -A "$sample".fastq > "$sample".fa # converts FASTQ to FASTA
```

Se cambió el nombre de los encabezados del fasta y se rompió el fasta en líneas de 80 caracteres.

```
awk '/^>/ {gsub(/.fa?$/, "", FILENAME); printf(">%s\n", FILENAME); next;} {print}' "$sample".fa | fold  
-w 80 > "$sample"_cns.fasta
```

Se eliminaron ficheros intermedios

```
rm "$sample".fastq "$sample".fa
```

Se añadieron N en las posiciones en las que ninguna variante (o referencia) hubiera cumplido el filtro:

```
nt_ref="$(grep -v ">" $REFERENCE | wc | awk '{print $3-$1}')" # Nucleotides of the reference  
c='n'  
nt_file="$(grep -v ">" "$sample"_cns.fasta | wc | awk '{print $3-$1}')" # Nucleotides of the  
consensus file  
if [[ "$nt_file" < "$nt_ref" ]]  
then  
    Ns=$(( $nt_ref - $nt_file ))  
    APPEND_Ns=$(printf "%c%.0s" $(seq 1 $Ns))  
  
    echo "$(cat "$sample"_cns.fasta)$APPEND_Ns" | fold -w 80 > "$sample".fasta  
elif [[ "$nt_file" = "$nt_ref" ]]  
then  
    echo "$(cat "$sample"_cns.fasta)" | fold -w 80 > "$sample".fasta  
fi  
  
done
```

Por último, se eliminaron ficheros intermedios

```
rm *_cns.fasta
```

c) Ensamblaje *de novo*

La reconstrucción de genomas *de novo* a partir de las lecturas limpias se realizó con SPades v3.14.1 (196). Este programa busca el solapamiento entre los extremos de las lecturas produciendo secuencias más largas, denominadas *contigs*. El resultado esperado sería un único *contig* con la longitud del genoma completo. No obstante, lo habitual a partir de la secuenciación por Illumina es obtener varias decenas de *contigs* por muestra. Esto suele deberse a que es muy complicado resolver zonas repetitivas del genoma, lo que provoca la generación de *contigs* que no pueden unirse en fragmentos más largos por la imposibilidad de determinar qué fragmento sigue a cuál.

La evaluación de la calidad de los ensamblados se realizó a partir de los recuentos estadísticos determinados con QCAST v5.0.2 (197). Este programa hace un recuento del número de *contigs* en que se encuentra fragmentado el genoma y su longitud. Un parámetro importante en este análisis es el N50. Es un valor que indica el número de *contigs* necesarios para cubrir el 50% del genoma. Para un ensamblaje ideal esperaríamos que el N50 fuese 1, es decir, todo el genoma se encuentra recogido en uno o unos pocos *contigs*. Por ello, cuanto menor es el N50, mejor es el ensamblado. El número total de *contigs* por sí solo no es informativo, puesto que en ocasiones hay un elevado número de fragmentos cortos pero la mayor parte del genoma está contenido en *contigs* muy extensos. El archivo tipo FASTA con los *contigs* que se generó para cada aislado fue filtrado con un *script* propio para eliminar aquellos *contigs* inferiores a 500 pb.

Comandos utilizados:

```
Spades.py -1 R1.fastq -2 R2.fastq -t 16 -o output
```

8. Estudio epidemiológico

El estudio epidemiológico de las cepas que parecían estar relacionadas (temporal o físicamente) se llevó a cabo, por un lado, a partir de los resultados obtenidos por la electroforesis en campo de pulso, así como mediante la obtención de árboles filogenéticos basados en el *core-genome*, donde se recogieron únicamente los genes compartidos por el grupo de genomas objeto del estudio. Estos árboles filogenéticos se obtuvieron a partir de los genomas ensamblados según se describe en los apartados anteriores.

Para construir el *core-genome*, se utilizó el programa ProteinOrtho6 (198), que detecta genes ortólogos (95% de umbral de identidad) entre distintas muestras. Con el fin de obtener un análisis estricto del *core-genome*, se utilizó el programa `grab_to_proteins.pl` que se encuentra dentro de ProteinOrtho6, para extraer los genes presentes en todas las muestras. Posteriormente, cada gen se alineó utilizando `mafft v7` (199), con la opción `-adjustdirection` que comprueba que todas las secuencias están en la misma dirección. Además, se utilizó también Trimal (200) , para eliminar todas las posiciones en los alineamientos con huecos en el 50% o más de las secuencias. Se obtuvo un alineamiento concatenado de todos los genes *core* para cada muestra utilizando `AMAS.py concat` (201). Finalmente, se obtuvo un árbol filogenético de máxima verosimilitud a partir del “*core-genome*” estricto, utilizando IQTREE (202). Los árboles obtenidos se visualizaron mediante la herramienta iTOL (203).

IV. Results



1. Isolates' characteristics

A total of 8612 isolates of *Klebsiella pneumoniae* were collected at the Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (Spain) from January 2015 to December 2018. Among them, 1013 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) strains (including clinical and surveillance isolates) corresponding to 237 patients were isolated. One isolate per patient was selected for the study, usually the first one except when strains were unavailable. In the hospital, active surveillance was performed at the moment of admission and once per week (axillar-rectal and pharyngeal swab culture) in patients at the intensive care unit (ICU), as well as in patients' follow-up in others wards that were previously colonized, according to the protocols established in our center.

2. Demographics and clinical features of patients infected and/or colonized by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates

Among the 237 patients enrolled, 150 were male (63%) and 87 were female (37%). The age of patients ranged between 26-99 years (average 72.01 ± 14.11). In **figure 3.1** and in **figure 3.2**, the gender and age distributions of the studied cohort are shown, respectively.

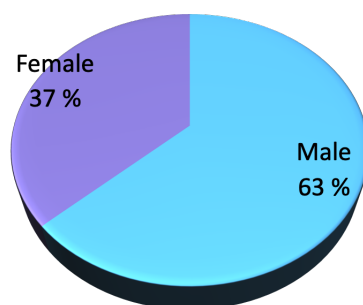


Figure 3.1. Gender distribution in patients infected and/or colonized by CRKP

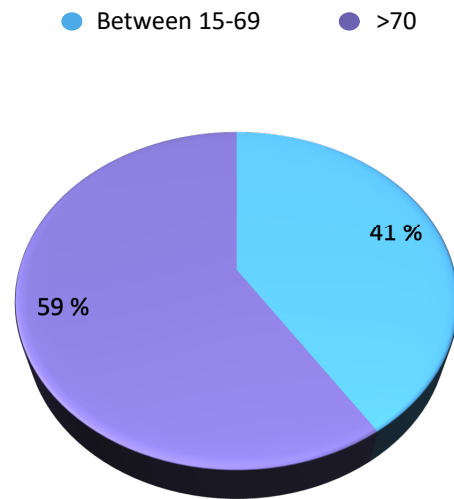


Figure 3.2. Age distribution of patients infected and/or colonized by CRKP

The age range in women was 26-99 years old (average 76.35 ± 13.85), whereas in men it was 28-98 years old (average 69.93 ± 12.86), not finding statistical differences between both genders and age.

Among the 1013 CRKP isolates, 607 (60%) were obtained from surveillance cultures (80% axillar-rectal, 20% pharyngeal swabs), whereas 406 (40%) were collected from clinical specimens: 234/1013 from urine samples (23%), 30/1013 from respiratory samples (3%) and 27/1013 from blood samples (3%). Other sample types found were surgical wounds and ulcers. In **figure 3.3** the sample types are shown.

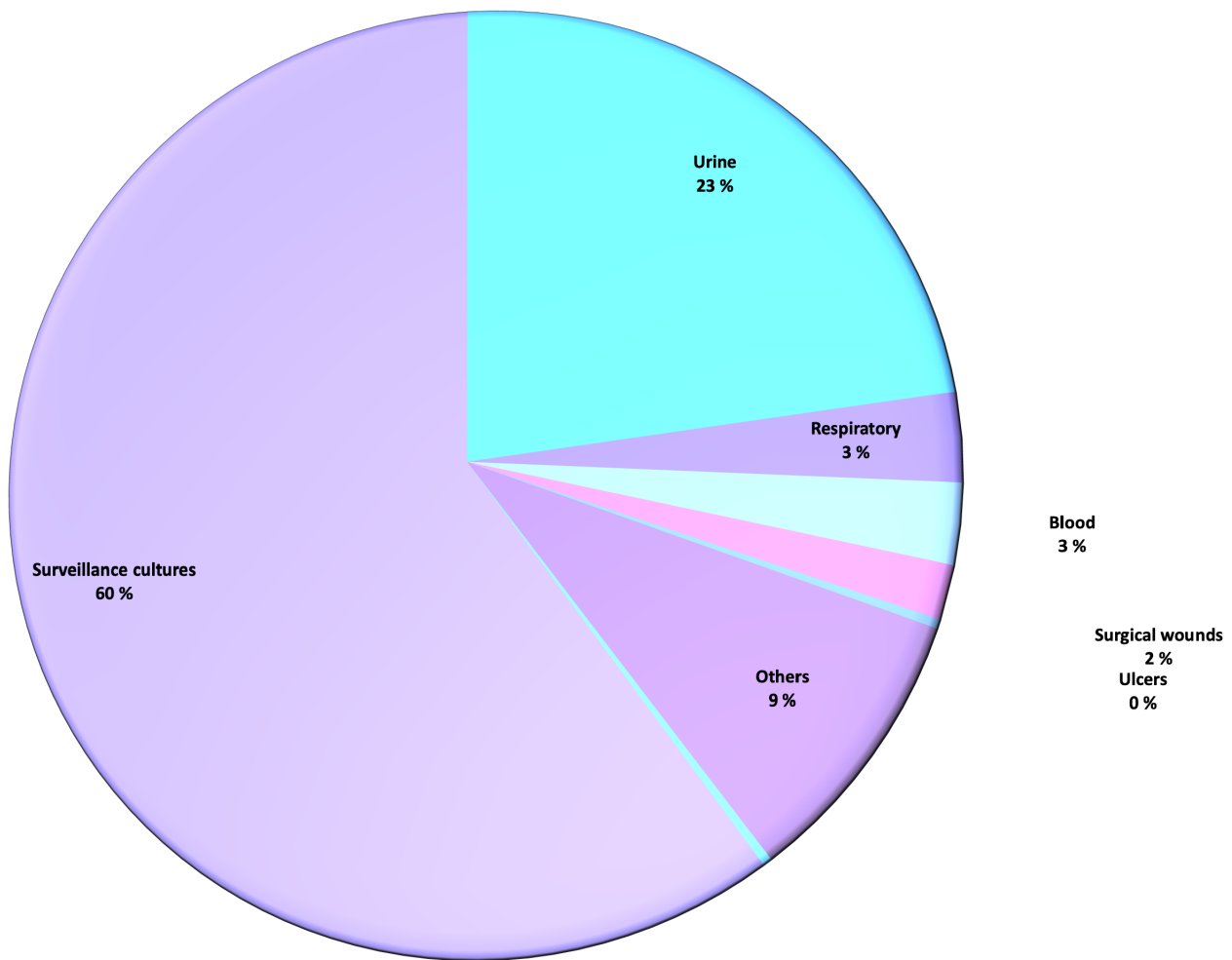


Figure 3.3. Sample distribution among the 1013 CRKP isolates

As stated before, only the first isolate from each patient was included in the study. Most of the patients (N= 199, 84%) had the same isolate in more than one sample. The sample distribution according to infection and colonization among the 237 that were selected for the study is shown in **figure 3.4.**

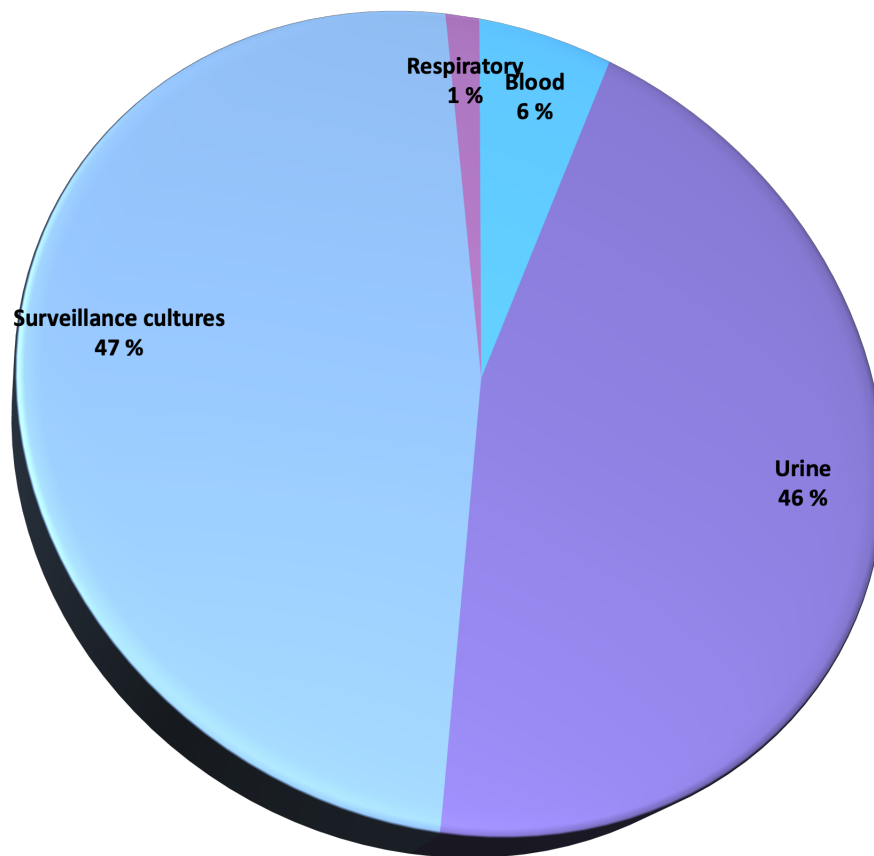


Figure 3.4. Sample distribution among the 237 CRKP isolates included in the study

Most of the samples were obtained in the intensive care unit (ICU) (21%), followed by the Internal Medicine Ward (18%) and the Emergency Ward (11%). Twenty-nine samples (13%) were isolated from institutionalized patients, mainly urine samples. Forty-five samples (19%) were obtained from patients receiving Primary Health-Care service. Other Hospital Wards from where samples were collected were: Cardiology, Surgery wards, Urology, Hematology, Endocrinology, Dermatology, Gynecology and Otorhinolaryngology. In **figure 3.5.**, the ward distribution is depicted.

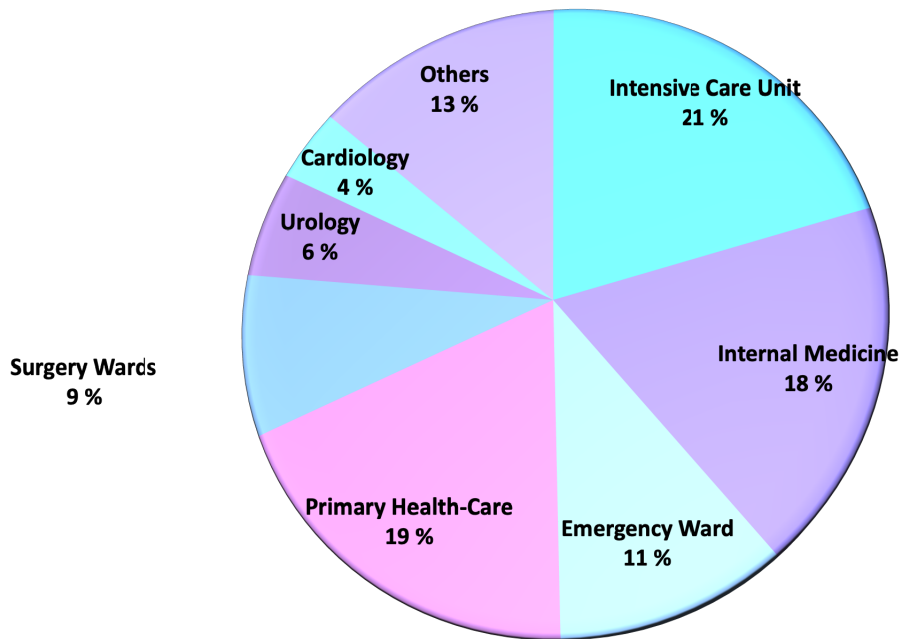


Figure 3.5. Distribution of the patients colonized and/or infected by CRKP among the different Hospital wards

In **figure 3.6**, the distribution of the sample type regarding their ward origin can be observed. Only those wards with a main sample type are shown in the figure. The other hospital wards did not have a prevalent sample type.

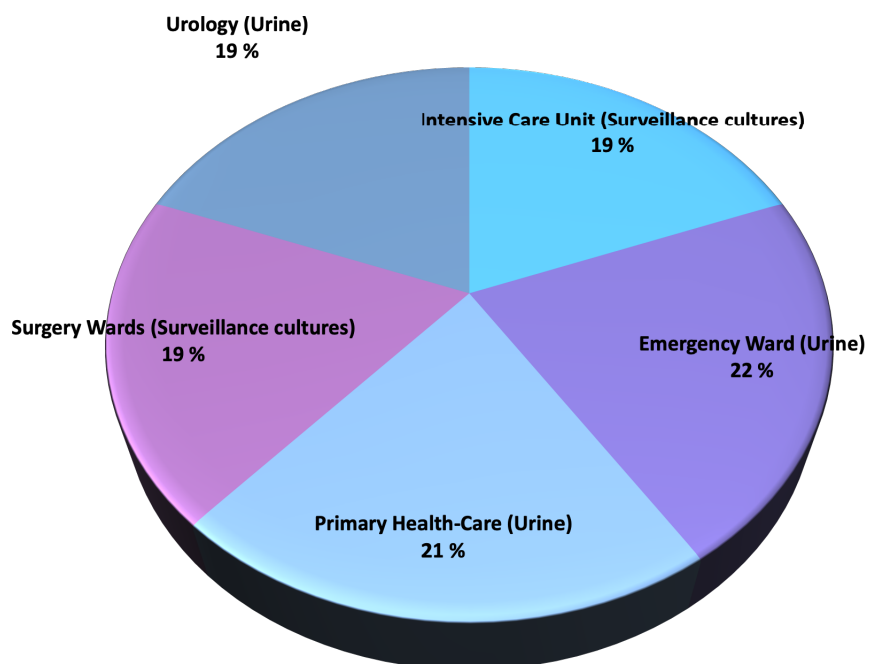


Figure 3.6. Main sample types found in each hospital ward

Regarding the origin of the samples, after analyzing the information available for each patient, we observed that 29 of the infections were community-acquired (13%), while 205 were infections and/or colonizations related to health-care assistance (87%). Sample distribution depending on the origin of the infection and/or colonization is shown in **figure 3.7**.

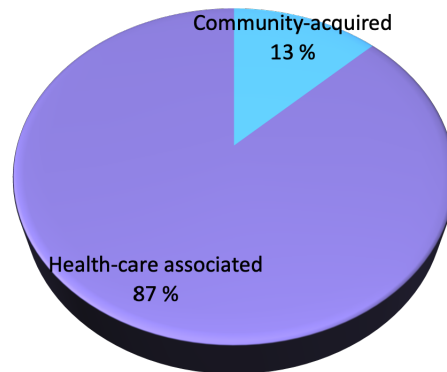


Figure 3.7. Sample origin distribution of CRKP

A total of 133 patients were found to have an infection by an CRKP (56%). CRKP previous colonization was observed in 58 infected patients (44%), but only information about previous colonization was collected from patients who had had a previous stay in the ICU. Fifty-six patients had clinical signs of sepsis at some point of hospitalization (24%), although not all of them were microbiologically confirmed (only 23, 41%), and 16 of them had pneumonia by CRKP (50% of them associated to mechanical ventilation).

Among the CRKP-infected patients, 106 (50%) had previously been admitted to the hospital, and those who had not, had other risk factors related to healthcare assistance such as urinary catheter, surgery complications, and/or previous antibiotic treatment.

Eighty-three (35%) patients had their infection secondary to surgery. One hundred and twelve (47%) patients had received antibiotic therapy in the previous month.

Regarding co-morbidities, fifty-nine (25%) patients suffered from *diabetes mellitus*, while only 2 suffered from cirrhosis. Fifty (21%) of them had chronic renal disease and 35 (15%) chronic

pulmonary disease. Fifteen (6%) of them showed either structural or functional uropathy, whereas 68 (29%) carried a urinary catheter.

Fifty-six (24%) patients were undergoing a neoplastic process while they had the infection from CRKP.

Statistical analysis was performed to find which risk factor(s) were related in our cohort to an increase in the probability of suffering an infection by CRKP (**table 3.1**).

The different risk factors were studied independently, and the results showed that there was statistical significance with an odds ratio higher than 1 in suffering an infection by CRKP if there had been a previous hospital stay, previous antimicrobial therapy and/or previous surgery. Regarding the risk factors related to the patient, there was also statistical significance for patients suffering from DM, those carrying urinary catheter and patients with chronic renal and/or pulmonary disease, showing higher probability to suffer a CRKP infection. In relation with the other risk factors studied (Uropathology and cirrhosis), the odds ratios were higher than one, but not statistically significant.

Table 3.1. Statistical results of risk factors associated to CRKP infection

Risk factor	Odds ratio	95% CI	p-value
Previous antibiotic therapy	430.71	26.5 – 6988	$p < 0.0001$
Previous hospital stays	388.70	23.95 – 6307	$p < 0.0001$
Surgery	258.49	15.91 – 4198	$p = 0.0001$
<i>Diabetes mellitus</i>	159	9.76 – 2589	$p = 0.0004$
Cirrhosis	5.04	0.24 – 105.61	$p = 0.29$
Chronic renal disease	128.37	7.86 – 2094	$p = 0.0007$
Chronic pulmonary disease	83.45	5.086 – 1369.23	$p = 0.0019$
Neoplasia	133.49	8.19 – 2174.51	$p = 0.0006$
Structural or functional uropathology	33.11	1.96 – 556.85	$p = 0.01$
Urinary catheter	192.95	11.86 – 3138	$p = 0.0002$

3. Antimicrobial susceptibility testing

Among the 237 isolates, ertapenem was the carbapenem with the highest non-susceptibility rates (237/237), followed by meropenem (121/237) and imipenem (75/237). Non-susceptibility to imipenem, meropenem, and ertapenem in all isolates was variable (MICs ranging from 1 to >8 mg/L).

In **figure 3.8**, differences in carbapenem resistance rates from 2015 to 2018 are shown.

Ertapenem has maintained 100% resistance rate throughout the four years of the study. Variable resistance rates are found in both Imipenem and Meropenem.

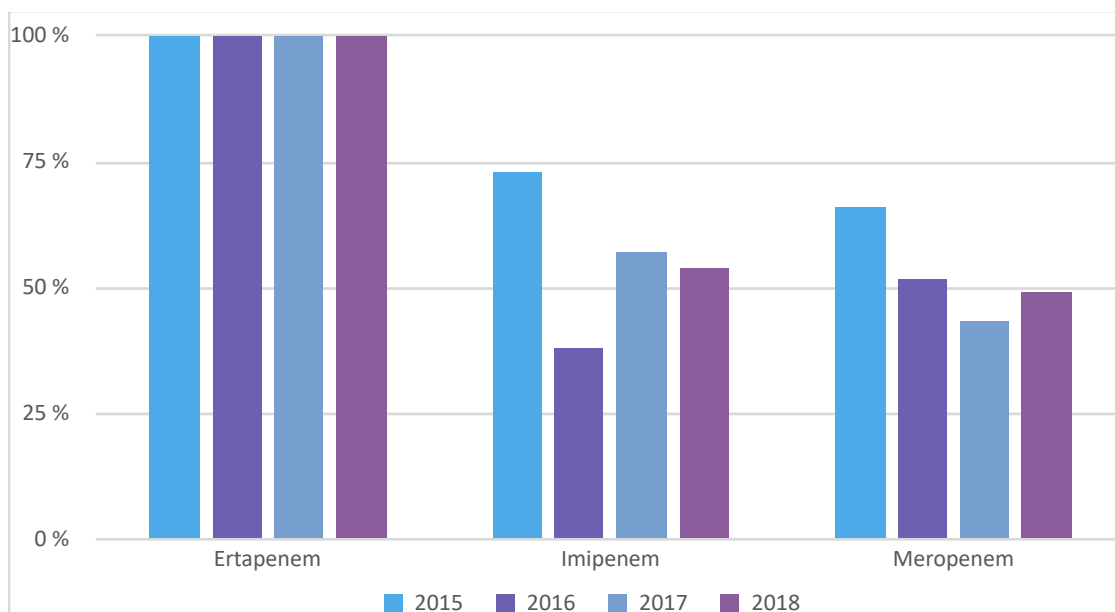


Figure 3.8. Resistance rates to the three carbapenems tested throughout the years

The distribution of antimicrobial susceptibility of all 237 CRKP isolates is shown in **table 3.2**. More than 90% (223/237) were non-susceptible to third generation cephalosporins (MICs > 4mg/L), and around 90% were also non-susceptible to quinolones. A moderate resistance, around 50%, was shown to tigecycline (MICs >2mg/L) and fosfomycin (MICs >64 mg/L). Regarding aminoglycosides, gentamicin and tobramycin showed higher resistance rates (MIC > 4mg/L), with almost 70% of the strains showing resistance. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole was

present in approximately 75% of the isolates. Colistin turned out to be the one antibiotic with the highest susceptibility rates (87%) (MICs < 2mg/L). Not all antibiotics were tested for all isolates, as the antibiotic susceptibility panel used depended on the sample type, as specified in methods section.

Among the isolates of the study, 199/237 (84%) were considered multi-drug resistant (MDR) and 38/237 (16%) extremely drug-resistant (XDR). No pandrug-resistant (PDR) isolates were found.

Antimicrobial susceptibility of the isolates was also classified in **table 3.3.** according to the sample type: surveillance culture vs. clinical samples. In the case of aminoglycosides, colistin, tigecycline and fosfomicin, the strains obtained from surveillance cultures have higher susceptibility rates than those obtained from clinical samples. Regarding the other antimicrobial agents, the differences were not significant.

Table 3.2. Susceptibility rates to antimicrobial agents assessed in 237 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates

Antimicrobial family	Antimicrobial agent (N, Nr of tested strains)	Susceptibility (%)	Antimicrobial family	Antimicrobial agent	Susceptibility (%)
β-lactams	Amoxicillin-clavulanate (n=237)	0.42	Quinolones	Ciprofloxacin (n=237)	10
	Cefepime (n=190)	15		Levofloxacin (n=237)	5
	Cefotaxime (n=237)	3.8		Norfloxacin (n=60)	4
	Cefoxitin (n=197)	25	Amino glycosides	Amikacin (n=237)	67.5
	Ceftazidime (n=237)	6		Gentamicin (n=237)	38.3
	Cefuroxime (n=235)	9		Tobramycin (n=237)	32
	Ertapenem (n=237)	0	Polymixin	Colistin (n=120)	87
	Imipenem (n=237)	68	Tetracycline	Tigecycline (n=180)	60.5
	Piperacillin/tazobactam (n=237)	3	Sulfonamides	Trimethoprim / Sulfametoxazol (n=233)	27
	Meropenem (n=237)	49	Fosfomycin	Fosfomycin (n=93)	45

Table 3.3. Differences in susceptibility rates in clinical samples vs. surveillance cultures

Antimicrobial agent	Global Susceptibility (%)	Susceptibility in Surveillance cultures (%) (N=61)	Susceptibility in Clinical samples (%) (N=176)
A m o x i c i l l i n - clavulanate (n=237)	0.42	0	0.42
Cefepime (n=190)	15	21	7
Cefotaxime (n=237)	3.8	0	5
Cefoxitin (n=197)	25	15	42
Ceftazidime (n=237)	6	5	8.5
Cefuroxime (n=235)	9	11	8
Ertapenem (n=237)	0	0	0
Imipenem (n=237)	68	65	69
P i p e r a c i l l i n / tazobactam (n=237)	3	5	2
M e r o p e n e m (n=237)	49	72	62
C i p r o f l o x a c i n (n=237)	10	15	11
L e v o f l o x a c i n (n=237)	5	5	10
Norfloxacin (n=60)	4	4	9
Amikacin (n=237)	67.5	100	71
Gentamicin (n=237)	38.3	72	39
Tobramycin (n=237)	32	60	30
Colistin (n=120)	87	67	23
Tigecycline (n=180)	60.5	72	38
Trimethoprim / Sulfamethoxazol (n=233)	27	31	24
Fosfomycin (n=93)	45	32	12

In the following figures (figures 3.9., 3.10., 3.11. and 3.12.) differences in resistance rates to all the antimicrobial families tested are shown for each year of the study.

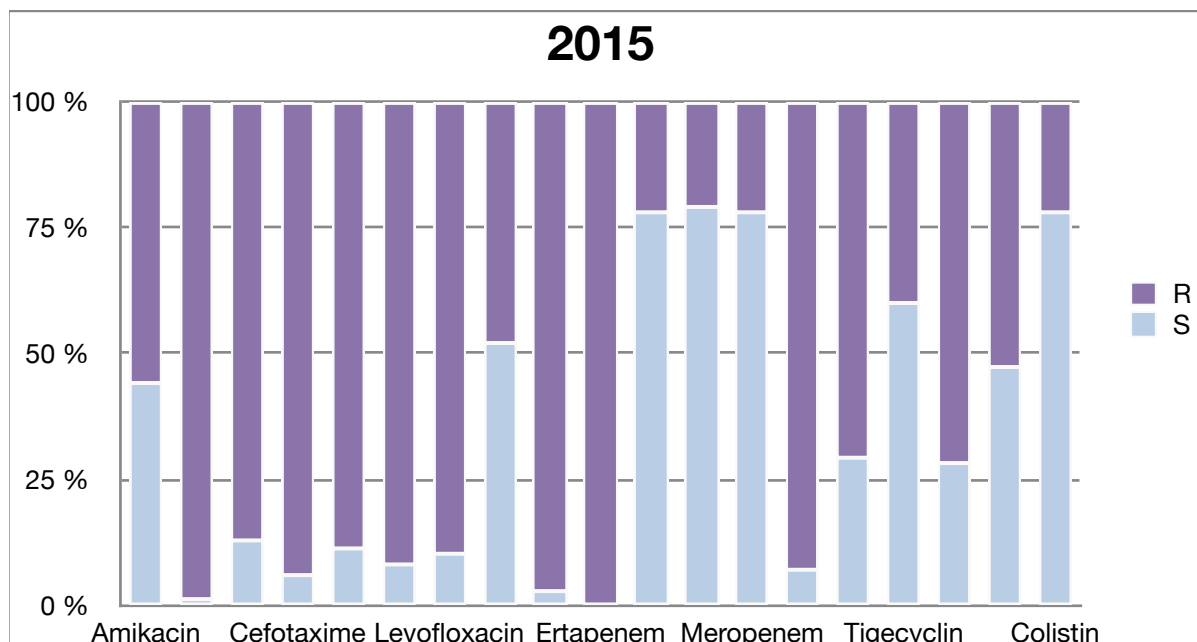


Figure 3.9. Resistance rates of the strains isolated during 2015. R= Resistant; S=Susceptible

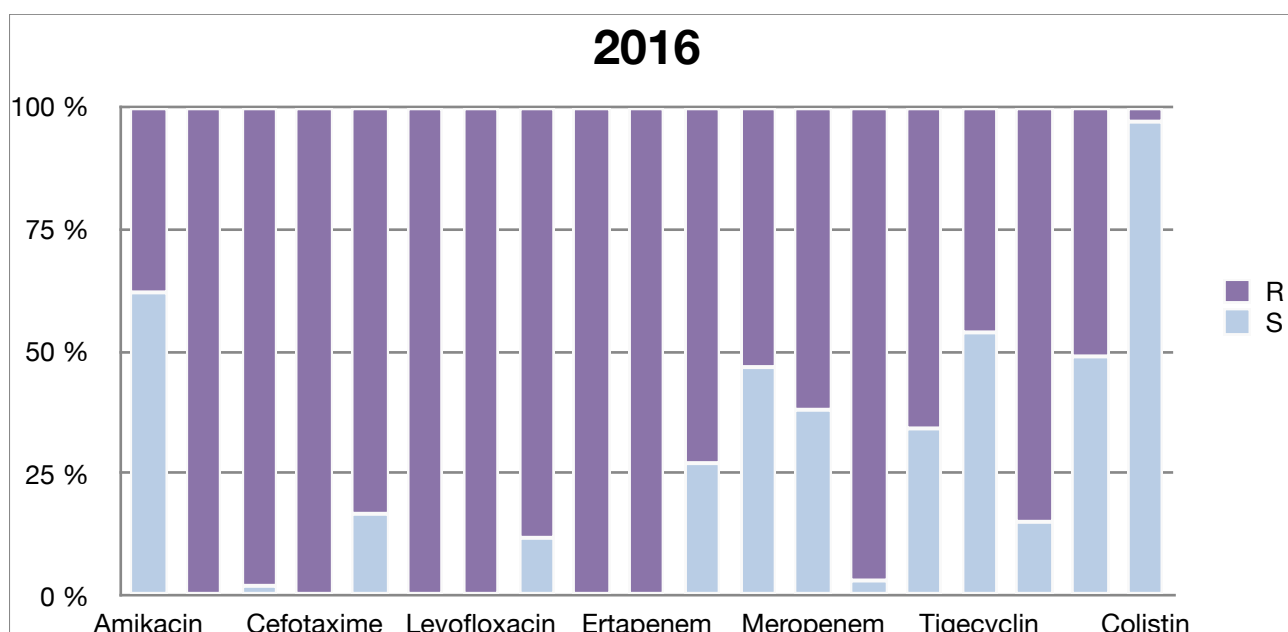


Figure 3.10. Resistance rates of the strains isolated during 2016. R= Resistant; S=Susceptible

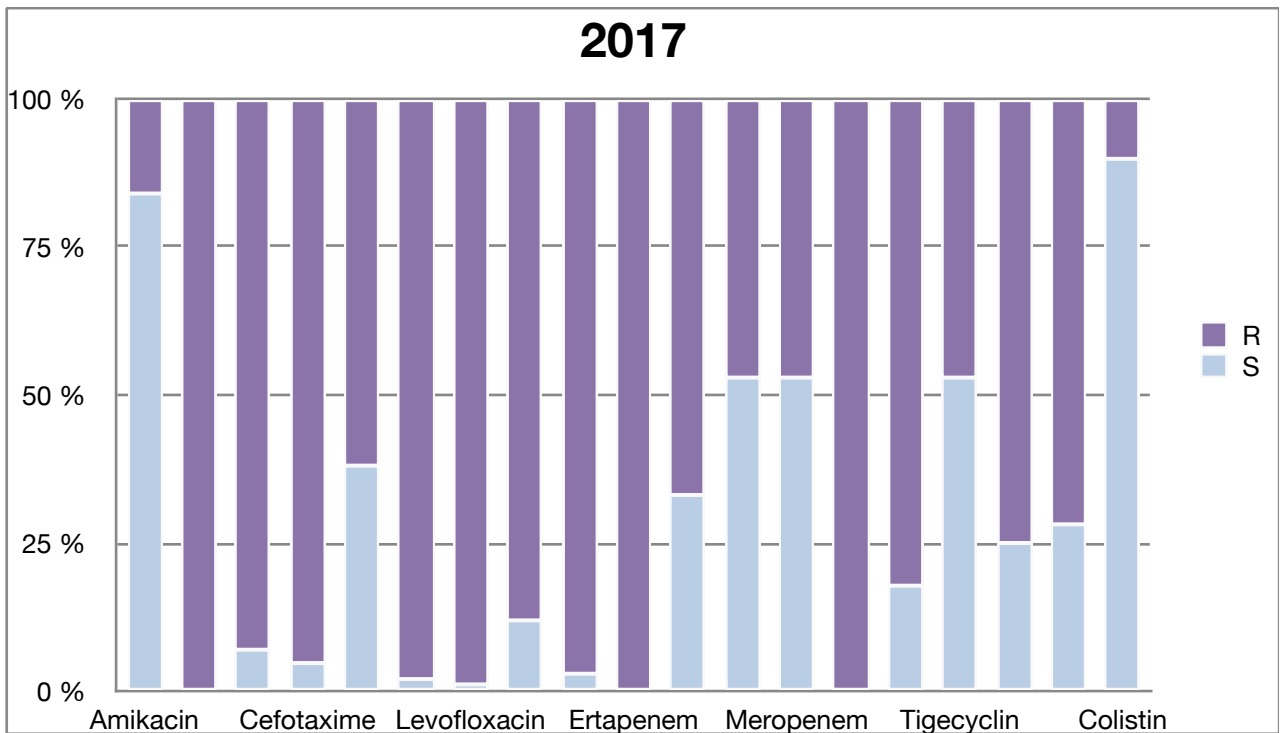


Figure 3.11. Resistance rates of the strains isolated during 2017. R= Resistant; S=Susceptible

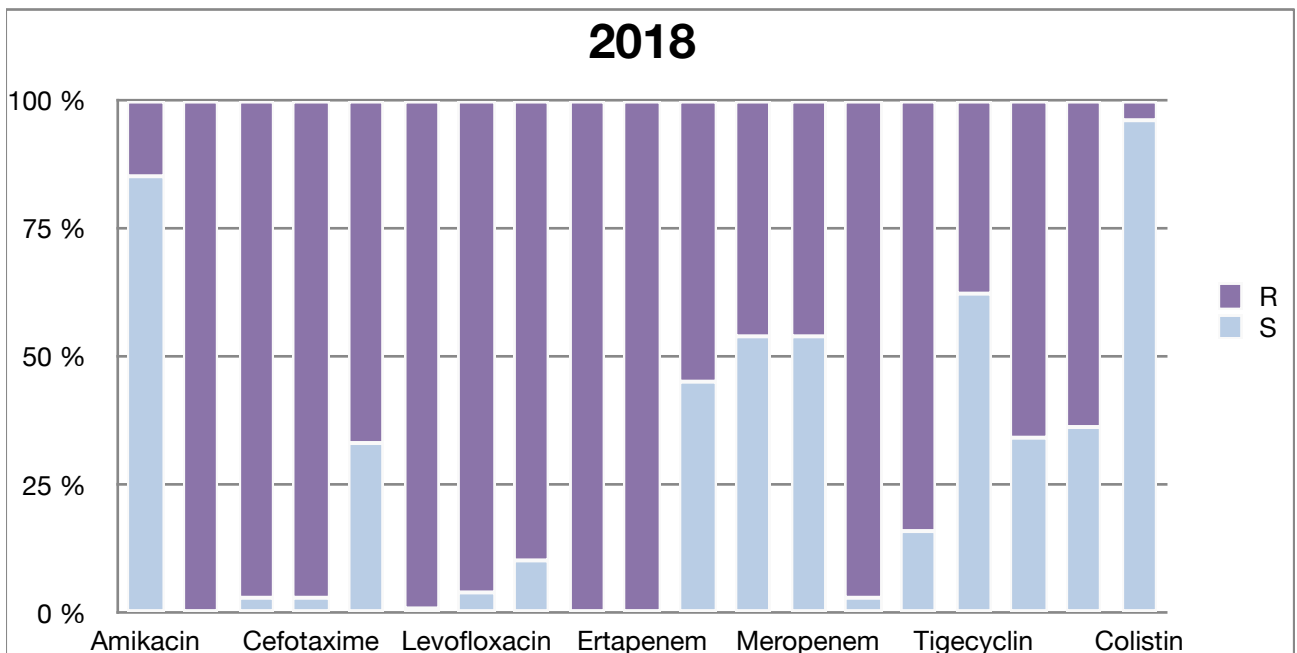


Figure 3.12. Resistance rates of the strains isolated during 2018. R= Resistant; S=Susceptible

4. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* typing: Multi-locus Sequence-typing

Typing of *K. pneumoniae* in this study was performed by MLST directly from the short reads obtained from Next-Generation Sequencing. Two hundred and five out of the 237 *K. pneumoniae* isolates underwent Next-Generation Sequencing, and complete genome sequences were obtained. After sequencing, a mean of 1,981,172.34 reads per sample were obtained, being 4,139,494 the maximum and 849,554 the minimum. FastQC evaluation was performed and reads showed a *Phred* quality higher than 30 along all positions. The mean GC content was 58%, and the average sequence length was 148.295 bp.

Phylogenetic lineages in *K. pneumoniae* were determined according to their Sequence-type (ST). Among the 22 STs detected, ST307 was the most prevalent one (78 isolates), followed by ST11 (57 isolates) and ST101 (36 isolates). Both ST437 and ST147 were detected in 8 and 5 isolates, respectively, and the other STs were found in less than 4 isolates each. In **table 3.4**, allelic profiles of each ST identified are shown, as well as the percentage of strains belonging to each ST.

Table 3.4. Allelic profiles of each *K. pneumoniae* sequence-type identified

ST	Nr. of strains	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>Mdh</i>	<i>Pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>
11	57	3	3	1	1	1	1	4
13	1	2	3	1	1	10	1	19
14	1	1	6	1	1	1	1	1
15	3	1	1	1	1	1	1	1
17	3	2	1	1	1	1	4	4
23	1	2	1	1	1	9	4	12
33	1	2	3	5	1	12	4	9
36	1	2	1	2	1	7	1	7
37	2	2	9	2	1	13	1	16
101	36	2	6	1	5	4	1	6
107	1	2	1	2	17	27	1	39
147	5	3	4	6	1	7	4	38
252	1	2	5	1	1	9	1	6
307	77	4	1	2	52	1	1	7
437	8	3	3	1	1	1	1	31
896	1	2	9	2	1	13	1	38
1081	1	2	3	2	2	6	4	12
1082	2	2	5	1	1	1	1	19
1564	1	4	1	10	1	196	4	256
2457	2	2	1	2	6	101	1	129

Throughout the years, persistence of certain STs can be observed. In 2015, ST11 was significantly the most identified, followed by ST307. However, in 2016 there is an inversion and ST307 becomes the most prevalent one. Besides, in 2016 ST101 appears for the first time in our settings and remains until 2018 although in a lower frequency. ST307 continues to be the most identified ST in 2017, and in 2018 it finds itself on the second place, as ST11 increases again two years later. In **figure 3.13** the changes in prevalence of each ST are shown.

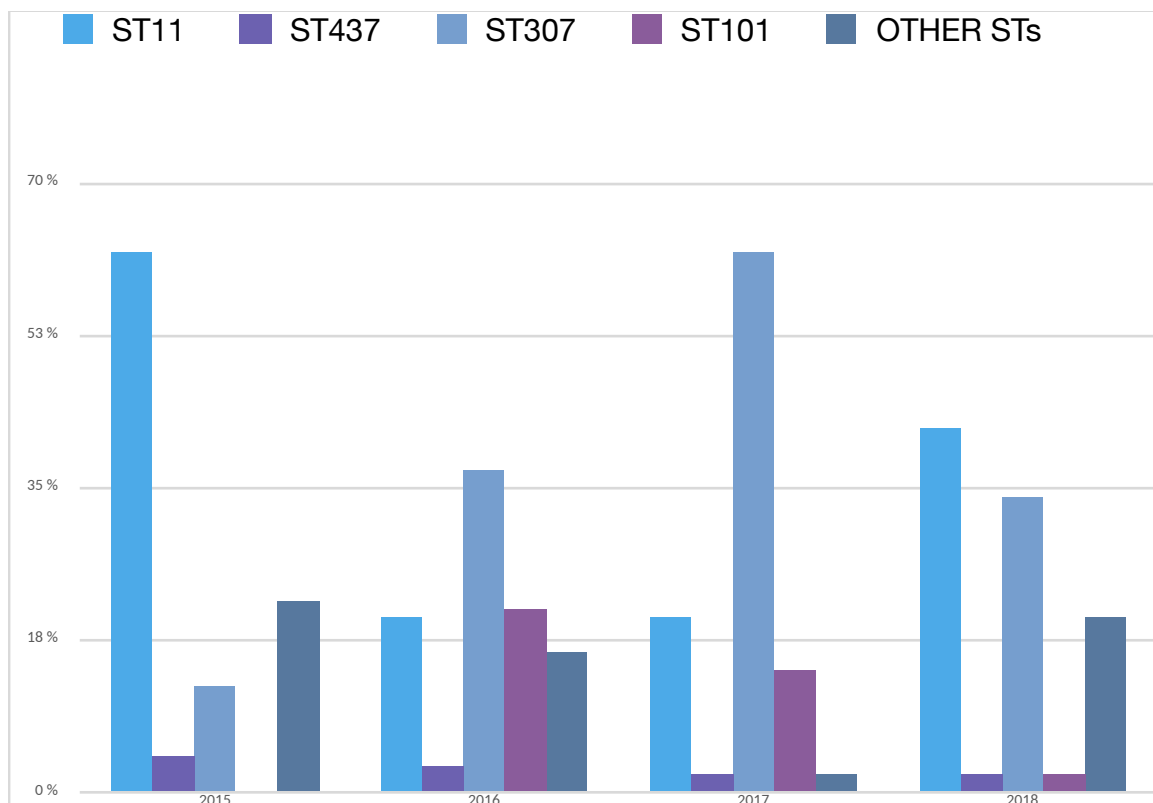


Figure 3.13. Prevalence of different STs from 2015 to 2018

5. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* resistome

The resistome is defined as the collection of all the genes that confer antibiotic resistance (204). In this study, we detected the genes and mechanisms that confer resistance to the most important classes of antibiotics used to treat *K. pneumoniae* infections, including β -lactams, aminoglycosides, quinolones, tetracyclines, polymyxins, etc. In this section, we summarized the results obtained after performing both phenotypic and genotypic methods for resistance detection.

5.1. Phenotypic detection of carbapenemase production

5.1.1. β -Carbatest (BioRad)

The test was performed to all the 237 strains. All carbapenemase producers (189/237) were positive for the β -Carbatest, whereas non-carbapenemase producers were negative; that is, neither false positive nor false negative results were obtained with the test.

5.1.2. Inhibitor-based approach for carbapenemase production detection

The test was performed to all the 237 strains. One hundred and forty strains were resistant to temocillin, suggesting OXA-48 production, 9 were resistant to temocillin and susceptible to meropenem+dipicolinic acid, suggesting co-production of OXA-48 and NDM; 12 strains were susceptible to cloxacillin being classified as AmpC producers, and 32 strains were susceptible to meropenem+dipicolinic acid, suggesting NDM production. The other 44 strains were negative for the test.

5.2. Genotypic detection of β -lactamase and carbapenemase genes by LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

All the isolates underwent loop-mediated isothermal amplification using Eazyplex® SuperBug CRE kit (Amplex). In **table 3.5**, all resistance genes found in the 237 isolates studied are shown.

Table 3.5. Resistance genes detected by PCR in 237 CRKP isolates

Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates	Resistance genes detected
11	<i>bla</i> _{OXA-48}
114	<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{CTX-M-1} group (<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{CTX-M-15})
1	<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{CTX-M-9} group (<i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>bla</i> _{CTX-M-14})
32	<i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-1} group (<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{CTX-M-15})
9	<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{NDM-1} + <i>bla</i> _{CTX-M-1} group (<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{CTX-M-15})
25	<i>bla</i> _{DHA}
5	<i>bla</i> _{CMY-II}
1	<i>bla</i> _{ACC}
10	<i>bla</i> _{CTX-M-1} group (<i>bla</i> _{CTX-M-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-3} , <i>bla</i> _{CTX-M-15})
4	<i>bla</i> _{CTX-M-9} group (<i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>bla</i> _{CTX-M-14})

Most of the CRKP isolates were *bla*_{OXA-48} producers, together with ESBL *bla*_{CTX-M-1} group. Not many AmpCs β-lactamases were detected, accounting only for less than 15% of the genes detected. Carbapenemase co-production was found in 9 isolates producing *bla*_{NDM-1} and *bla*_{OXA-48}, together with *bla*_{CTX-M-1} group ESBL. Fifteen isolates gave negative results. In **figure 3.14**, resistance genes detected by isothermal PCR are shown.

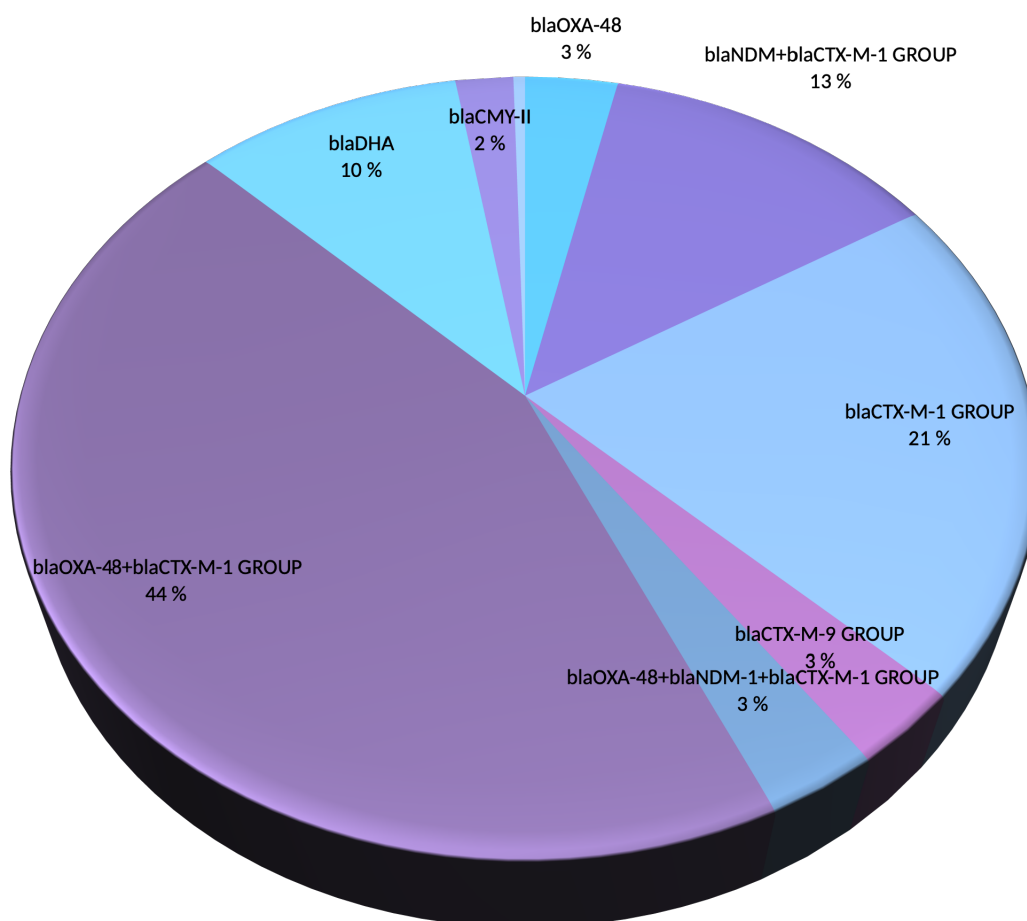


Figure 3.14. β -lactamase genes detected by isothermal PCR in the studied isolates

5.3. Genotypic detection of antimicrobial resistance genes or mechanisms applying Next-Generation Sequencing

The study of the resistance genes for the 205 strains was performed using short-read sequence data obtained from all isolates, by running the ARIBA program. Here, the resistance genes found are classified according to their antimicrobial family.

5.3.1. β -lactam resistance genes

AmpH. AmpH is an AmpC related enzyme functioning as penicillin-binding protein (PBP), and it was found in all isolates.

OXA-1. The oxacillinase *bla*_{OXA-1} was found in 147 (71%) of the isolates.

TEM family. *bla*_{TEM}-type genes were found in 81 (40%) of the isolates. *bla*_{TEM-30} was the most frequently identified one. In **table 3.6**, the different variants are shown, which are inhibitor-resistant β -lactamases.

Table 3.6. *bla*_{TEM}- family resistance genes detected

Resistance gene detected	Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
<i>bla</i> _{TEM-54}	4
<i>bla</i> _{TEM-30}	77

SHV family. *bla*_{SHV}-type genes were found in 68 of the isolates studied (33%). The most frequently identified type was *bla*_{SHV-11}. In **table 3.7**, the different variants are shown.

Table 3.7. *bla*_{SHV}-family resistance genes detected

Resistance gene detected	Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
<i>bla</i> _{SHV-1}	4
<i>bla</i> _{SHV-11}	53
<i>bla</i> _{SHV-12}	5
<i>bla</i> _{SHV-2}	1
<i>bla</i> _{SHV-13}	1

CTX-M family. A total of 159 genes belonging to *bla*_{CTX-M} family were detected. In **table 3.8**, the different genes identified and their groups are shown. The most frequently detected *bla*_{CTX-M} gene was *bla*_{CTX-M-15}, found in more than 60% of the isolates.

Table 3.8. *bla*CTX-M-family resistance genes detected

Resistance gene detected		Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
<i>bla</i> CTX-M-1 GROUP	<i>bla</i> CTX-M-1	29
	<i>bla</i> CTX-M-3	3
	<i>bla</i> CTX-M-15	122
<i>bla</i> CTX-M-9 GROUP	<i>bla</i> CTX-M-9	2
	<i>bla</i> CTX-M-14	2
<i>bla</i> CTX-M-32		1

AmpC β-lactamase. A total of 42 genes belonging to AmpC β-lactamase family were detected. In **table 3.9**, the different genes identified are shown. The most frequently detected AmpC gene was

*bla*_{DHA-1}.

Table 3.9. AmpC resistance genes detected

Resistance gene detected	Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
<i>bla</i> _{DHA-1}	37
<i>bla</i> _{CMY-II}	5
<i>bla</i> _{ACC}	1

OXA-48. A total of 118 producers of *bla*_{OXA-48} carbapenemase genes were detected. 109 of them harbored also an ESBL gene, mostly *bla*_{CTX-M} but also *bla*_{SHV}-type in a few cases. Carbapenemase co-production was found in 7 cases with *bla*_{NDM} metallo-β-lactamase.

NDM metallo-β-lactamase. *bla*_{NDM} gene was found in 32 isolates (16%). It was always carried together with an ESBL *bla*_{CTXM} gene. In **table 3.10**, the different variants are shown. *bla*_{NDM-23} is a new variant that has been identified for the first time in our study. NCBI accession number is pending.

Table 3.10. *bla*NDM-family resistance genes detected

Resistance gene detected	Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
<i>bla</i> _{NDM-1}	29
<i>bla</i> _{NDM-23}	3

5.3.2. Non- β -lactam resistance genes

a) Aminoglycosides

Aminoglycoside resistance genes were found in 148 isolates of the study. Inactivating enzymes were most frequently detected than methyltransferases. *AadA2* was the most frequently identified nucleotidyltransferase-encoding gene, whereas *Aph3-Ia* was the most prevalent aminoglycoside phosphotransferase-encoding gene. In **table 3.11** all the resistance genes detected are shown.

Table 3.11. Aminoglycoside resistance genes detected

Resistance mechanism	Resistance gene detected	Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
Inactivating enzymes	<i>aac3-IIa</i>	9
	<i>aac3-IIId</i>	7
	<i>aac3-VIa</i>	1
	<i>aadA1</i>	5
	<i>aadA2</i>	46
	<i>aadA5</i>	1
	<i>aadA16</i>	1
	<i>aph3-Ia</i>	31
	<i>aph4-Ia</i>	18
Methyltransferases	<i>rmtF</i>	28
	<i>armA</i>	1

b) Sulfonamides

Sulfonamide resistance genes were detected in 194 isolates included in the study; *sul2* was the most prevalent one in the strains studied. In **table 3.12** all the genes detected are shown.

Table 3.12. Sulfonamide resistance genes detected

Resistance gene detected	Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
<i>Sul1</i>	78
<i>Sul2</i>	111
<i>Sul3</i>	5

c) Trimethoprim

Trimethoprim resistant dihydrofolate reductases were detected in more 136 strains included in the study. *Dfra14* gene was the one most frequently detected. In the table below all the resistance genes detected are shown (**table 3.13**).

Table 3.13. Trimethoprim resistance genes detected

Resistance gene detected	Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
<i>dfrA1</i>	2
<i>dfrA12</i>	28
<i>dfrA14</i>	90
<i>dfrA15</i>	1
<i>dfrA16</i>	4
<i>dfrA17</i>	2
<i>dfrA25</i>	3
<i>dfrA26</i>	1
<i>dfrA27</i>	5

d) Rifampicin

Resistance genes to Rifampicin were only detected in 57 isolates. In the table below all the resistance genes detected are shown (table 3.14).

Table 3.14. Rifampicin resistance genes detected

Resistance gene detected	Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
<i>arr-2</i>	35
<i>arr-3</i>	22

e) Tetracyclines

Tetracycline resistance determinants were found in 102 isolates. In the table below all the resistance genes detected are shown.

Table 3.15. Tetracycline resistance genes detected

Resistance gene detected	Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
<i>tet(A)</i>	97
<i>tet(D)</i>	2
<i>tet(E)</i>	3

f) Fluoroquinolones

Several resistance genes were detected regarding the fluoroquinolone family. In the table below all the resistance genes detected are shown (Table 3.16).

Table 3.16. Fluroquinolone resistance genes detected

Resistance gene detected	Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
<i>ParC</i>	187
<i>GyrA</i>	191
<i>Qnr</i>	126
<i>Aac-6'-Ibcr</i>	170
<i>OqxAB</i>	205

g) Colistin

Very few mutations were found regarding colistin resistance. Inactivation or down-regulation of *mcrB* gene confers colistin resistance. *Mcr* gene, which is a plasmid-borne phosphoethanolamine transferase was not found in the 205 isolates studied. In **table 3.17**, both resistance genes and mutations related to colistin resistance are shown.

Table 3.17. Colistin resistance genes detected

Resistance gene detected	Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
Mutations in <i>mcrB</i>	5
<i>mcr</i>	0

h) Fosfomycin

FosA gene conferring resistance to Fosfomycin was detected in 169 out of the 205 sequenced isolates.

5.4. Resistome and Sequence-type comparison

Resistance patterns were studied according to the sequence-type. It was found that there was a strong relationship between the ST and the genes harbored. In **table 3.18**, the most common STs and their resistance genes are shown.

Strains belonging to ST101 did not harbor neither *FosA* genes nor *Tet* and *DfrA* genes, but they were the only ones harboring *RmtF* genes. The only sequence-types harboring *bla*_{NDM-1} were ST101 and ST437, whereas *bla*_{OXA-48} was found in ST11, ST101, ST307, ST437 and ST147. Strains belonging to ST37 always harbored the same genes, whereas the other sequence types were more variable specially regarding β -lactamase genes.

Table 3.18. Resistance patterns according to sequence-types

ST	Resistance pattern															
	<i>Acc(6')</i> - <i>Ib-cr</i>	<i>Aph</i>	<i>ARR</i>	<i>bla</i> _{DHA} -1	<i>bla</i> _{CTX} -M	<i>bla</i> _{OXA} -1	<i>RmtF</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{OXA} -48	<i>bla</i> _{SH} V	<i>Cat</i>	<i>FosA</i>	<i>OqxAB</i>	<i>Qnr</i>	<i>Tet</i>	<i>DfrA</i>
11	X	X	X	X	V	X	-	-	V	X	X	X	X	V	V	V
101	X	X	X	V	X	X	V	V	V	X	X	-	X	X	-	-
307	X	X	-	X	X	X	-	-	V	X	X	X	X	X	X	X
437	X	X	X	-	V	X	-	V	V	X	X	X	X	V	X	X
147	V	V	-	-	X	X	-	-	V	X	X	X	X	V	V	V
37	X	X	-	-	X	X	-	-	-	X	X	X	X	X	X	X

X= Gene is always present; V=presence of the gene is variable

5.5. Porin mutation detection

Porin mutations were detected in 191 out of all the isolates studied after launching the reads from NGS against the CARD database as previously described. The mutant porin protein in all cases was *OmpK36*. The isolates with no porin protein mutations belonged to sequence-types 101, 307 and 11.

5.6. Concordance between genotype and phenotype

The concordance between genotype and phenotype was compared, obtaining good levels of agreement for most of the antibiotics, except for aminoglycosides, tetracyclines, imipenem and meropenem (highlighted in red in the table). Results are shown in the table below.

Table 3.19. Concordance between genotype and real phenotype

Antimicrobial	Phenotypic resistance (%)	Genes conferring resistance	Level of agreement genotypic-phenotypic expression (%)
Penicillins	100	<i>blaOXA-1</i> <i>blaCTX-M</i> <i>blaSHV</i> <i>blaTEM</i>	100
Cephalosporins	90	<i>blaCTX-M</i> <i>blaSHV</i> <i>blaTEM</i>	100
Ertapenem	97	<i>blaOXA-48</i> <i>blaNDM-1</i>	100

Imipenem	58	<i>blaOXA-48</i> <i>blaNDM-1</i>	50
Meropenem	57	<i>blaOXA-48</i> <i>blaNDM-1</i>	50
Aminoglycoside s	47	<i>rmtF</i> <i>Aac3</i> <i>Aad2</i> <i>Aph3</i> <i>Aph4</i>	63
Tetracyclines	40	<i>TetR</i>	40
Fluoroquinolon es	100	<i>Aac6Ib-cr</i> <i>Qnr</i> <i>Oqx</i>	100

6. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* virulome

The virulome is considered the assembly of factors that a pathogen requires for virulence (205). In this study, we have characterized the CRKP virulome by applying NGS. Phenotypic tests such as the *String test* were also performed.

6.1. String test

The test was performed to all the 237 isolates of CRKP isolated between 2015 and 2018, with the objective of detecting the presence of the hypervirulent phenotype. Seven isolates were positive for the string test out of the 237 isolates tested, but only one isolate was confirmed genotypically (See section 6.3).

6.2. Capsular polysaccharide (K antigen), *wzi* gene and capsular lipopolysaccharide (O antigen)

Among the 205 *K. pneumoniae* isolates sequenced in this study, serotype K102 was the most prevalent one, followed by K17, K13 and K105. Analysis of the *wzi* genes for capsular typing was also performed, showing in most of the cases the same sequence for a particular K-serotype. The most prevalent *wzi* sequence was *wzi173*, which corresponded to K102, followed by *wzi137*, corresponding to K17, *wzi243* corresponding to K13 and *wzi75* corresponding to K105.

Serotype K1, related to hypervirulence, was reported only in one isolate, which belonged to ST23 and was positive for *rmpA* gene testing. The sample was a pharyngeal exudate obtained from active surveillance in a patient from the intensive care unit, in which β -lactam resistance genes found were only *bla*_{DHA-1} (ampC β -lactamase) and *bla*_{SHV-190}. According to the laboratory database, no other samples from this patient were collected, meaning that the patient did not suffer an infection from this strain in the period he was hospitalized.

Regarding lipopolysaccharide antigen, only five types were detected, although two types had two variants each. Among the 205 isolates, 20% were O1 (90% O1v1 and 10% O1v2), O2 accounted

for 55% of the isolates (93% were O2v2 and 7% O2v1). O3 type was found in 18% of the isolates studied, while O4 and O5 were only detected in 4% and 2% of the cases, respectively.

In **figure 3.15** and **figure 3.16**, capsular serotypes and *wzi* genes are shown.

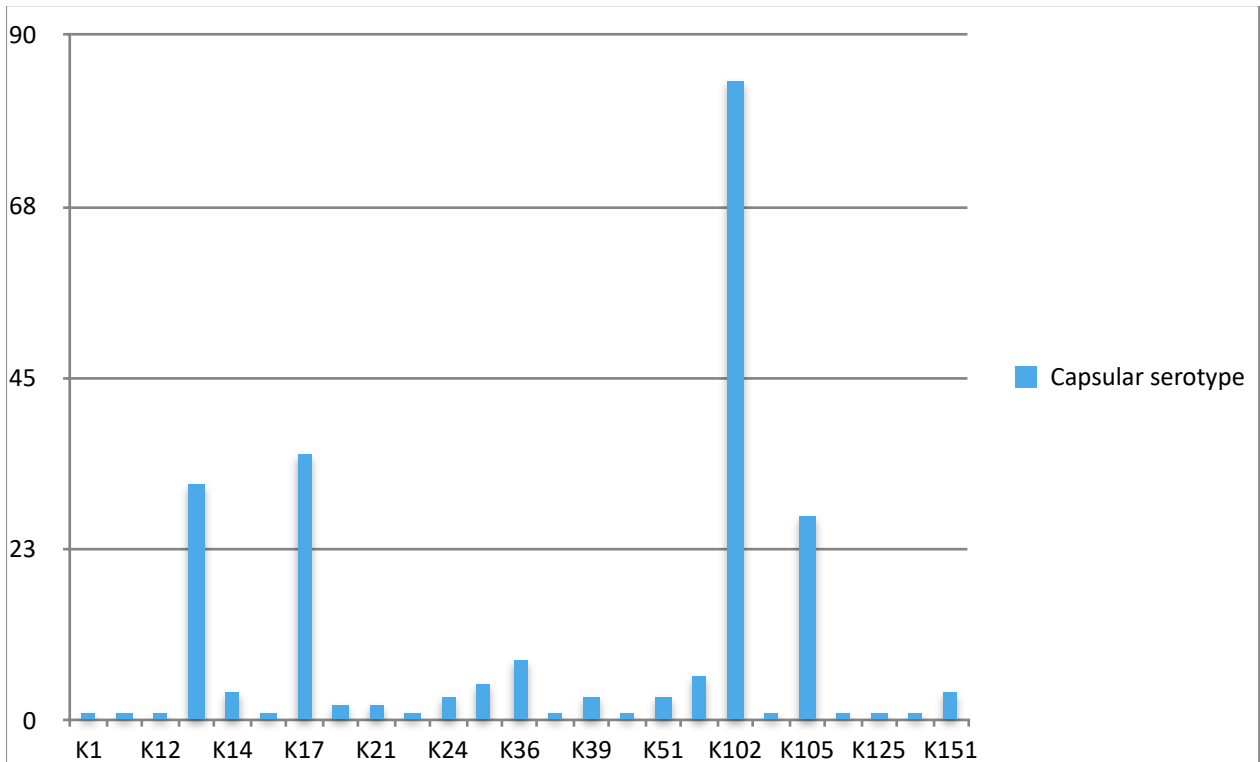


Figure 3.15. Capsular serotypes found in the 237 *K. pneumoniae* isolates

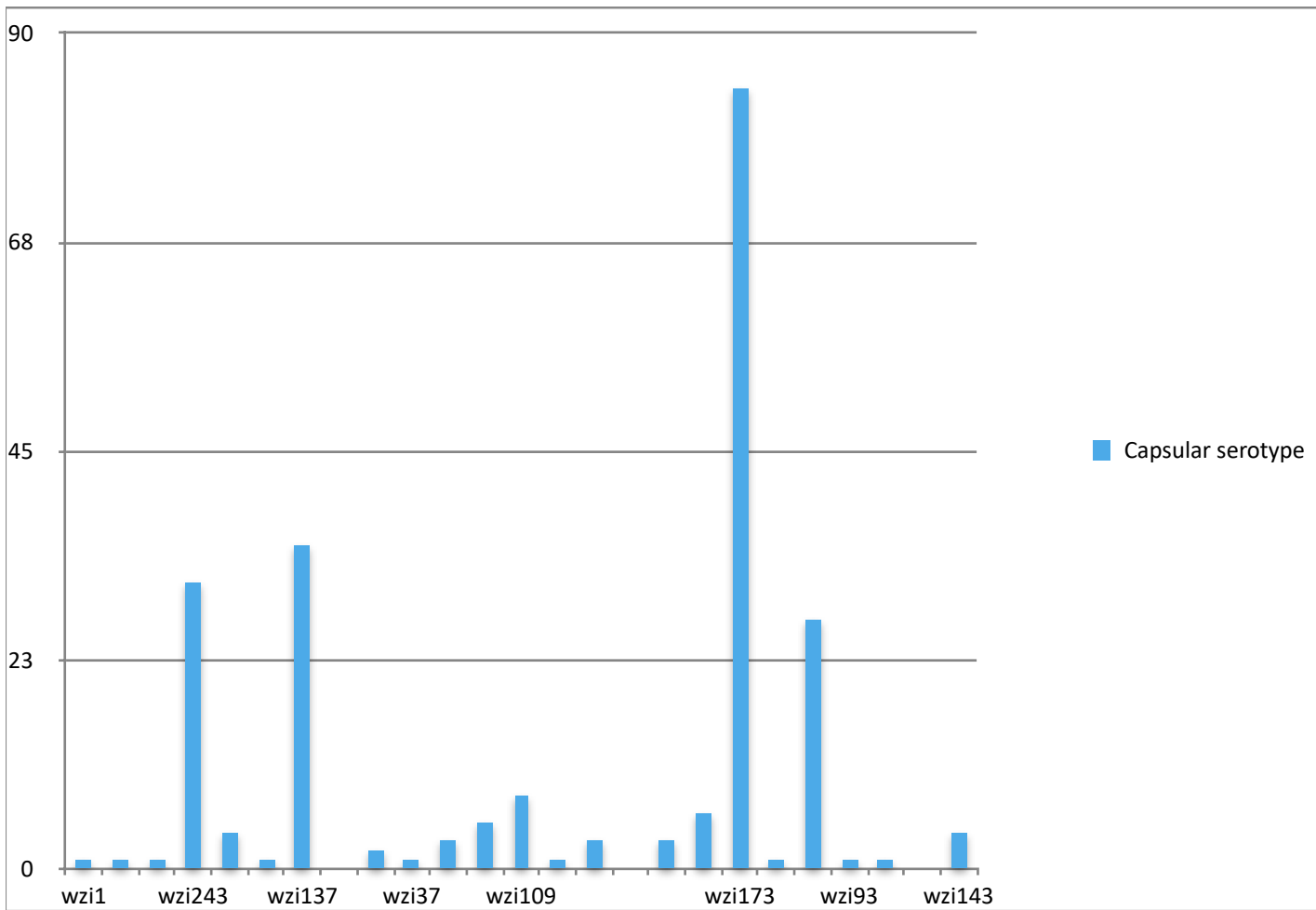


Figure 3.16. *wzi* genes detected in the 237 *K. pneumoniae* isolates

The capsule types almost shared the same level of diversity as the sequence types, with a capsular type associated with certain sequence types; whereas the O-antigen types (**figure 3.17**) are, as expected, less diverse but dominated through type O2.

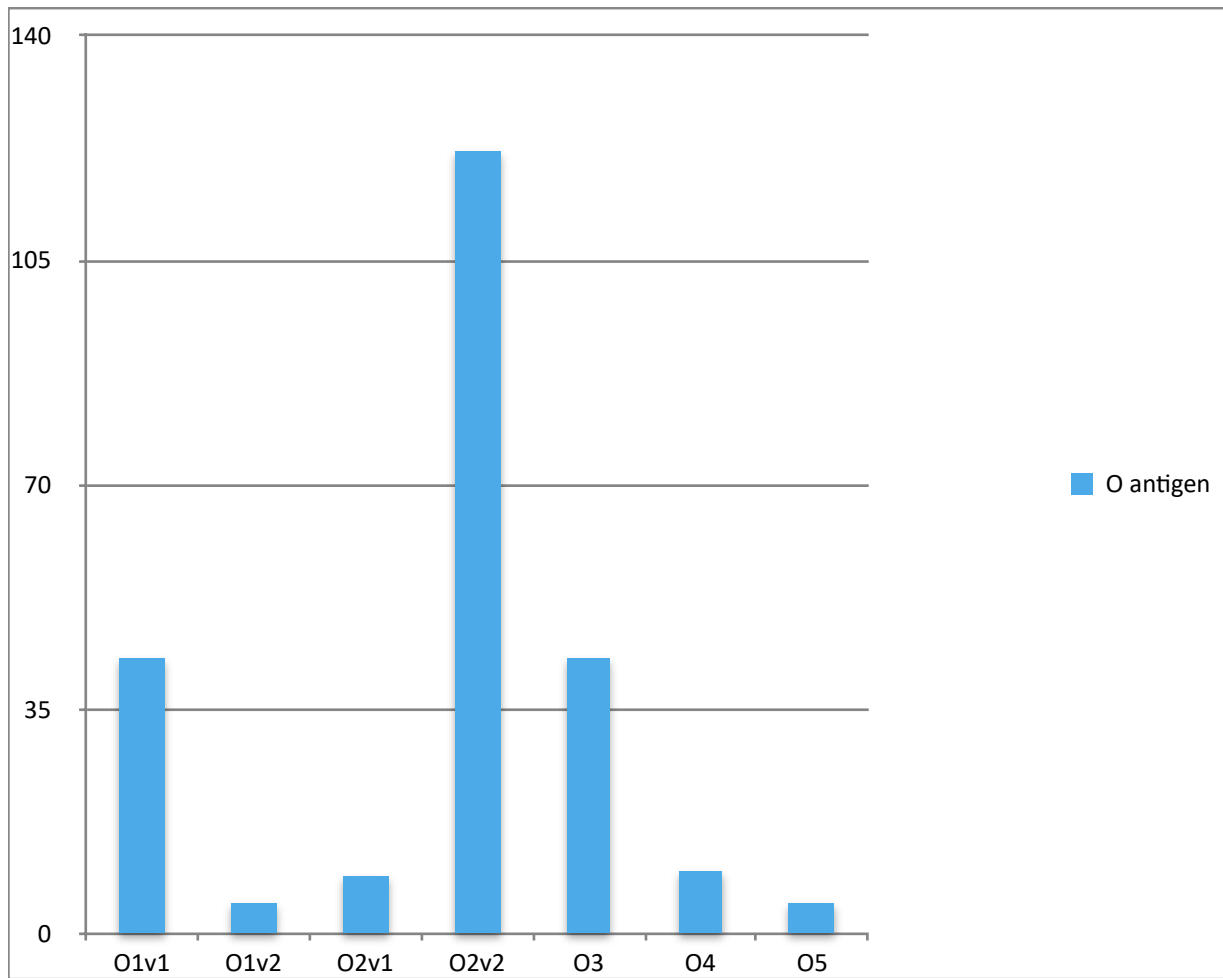


Figure 3.17. O antigen types found in the 237 *K. pneumoniae* isolates

Relationship between sequence-type, capsular type, *wzi* gene and O antigen is shown in **table 3.20**. Each ST was found to have a specific K-type, *wzi* gene and O antigen except for ST11 which had three different types and ST37 which had two different ones.

Table 3.20. Relationship between STs, K-type, *wzi* gene and O-antigen

Sequence-type	K-type	<i>wzi</i> gene	O-antigen
101	17	137	O1v1
307	102	173	O2v2
437	36	109	O4
11	105	75	O2v2
	24	24	O2v1
	13	243	O3b
147	64	64	O2v1
15	39	24	O1v1
	112	93	O1v1
23	1	1	O2v2
107	103	74	O1v1
1081	37	90	O1v1
1082	51	104	O1v2
13	19	Unknown	O1v2
14	16	16	O1v1
17	25	141	O5
2457	21	263	O3
33	13	112	O3
252	51	104	O1v2
36	27	27	O2v2
449	22	37	O1v1
896	3	59	O2v2
37	14	14	O3
	12	2	O3

6.3. Other virulence factors

Numerous accessory gene-encoded virulence factors are known to further enhance the severity of *K. pneumoniae* infections and/or the propensity to cause disease. The following virulence factors have been found in the 205 sequenced strains:

Acquired siderophores. Siderophore systems comprise iron-chelating molecules that can competitively scavenge iron from host proteins or other sources, and surface receptors for internalization. Four systems have been described in *K. pneumoniae*: enterobactin (core siderophore; encoded by *ent*) and yersiniabactin, aerobactin and salmochelin (accessory or acquired siderophores; encoded by *ybt*, *iuc* and *iro*, respectively). Aerobactin genes (*iuc*) were found in 8 strains, 7 of them belonging to ST11 and the other one belonging to ST23, while salmochelin (*iro*) was detected only in one of those 8 strains (ST23). Yersiniabactin (*ybt* locus) was found in 106 out of the 205 genomes (52%). Fourteen lineages of *ybt* locus were identified. *Ybt* is located within ICEkp, which is an integrative conjugative element.

In **table 3.21**, Yersiniabactin sequence-types are shown.

Table 3.21. Classification of Yersiniabactin sequence-types according to strains sequence-types

Isolate ST	Yersiniabactin	YbST	Colibactin	Nr. of isolates
23	1	47	Yes	1
101	9	183	No	38
437	9	183	No	2
14	10	107	No	1
449	10	95	No	1
11	10	11	No	31
17	15	231	No	1
11	16	277	No	25
13	17	289	Yes	2

Colibactin. It is a genotoxic polyketide, which induces DNA damage in eukaryotic cells.

Clb genes were found in three strains, two of them belonging to ST13 and the other one belonging to ST23. The *clb* locus was present in 1% of all *K. pneumoniae* and 3% of *ybt+* genomes.

Hypermucoidy. Hypermucoidy is the most well-known virulence factor for *K. pneumoniae* but its genetic basis and contribution to disease are not straightforward.

Only one strain was positive for *rmpA* gene, related to hypervirulent strains (ST23), and it was not isolated from a clinical sample.

Fimbrae. Fimbriae type I and III were not found in any of the strains.

7. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* mobilome

The mobilome is defined as all mobile genetic elements found in a microorganism. This influences the composition of the microbial communities and the spread of antimicrobial resistance genes via horizontal gene transfer (206). In this study, we characterized the mobilome of CRKP isolates by applying Next-generation Sequencing (NGS) and annotating the plasmids found. Conjugation assays were also performed to prove the horizontal transfer of resistance determinants.

7.1. Plasmid characterization

7.1.1. Plasmid incompatibility groups

In this study, the diversity of plasmids present in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* was investigated using short-read sequence data obtained from the 205 sequenced isolates, in order to assess the prevalence of the carbapenemase-encoding plasmids in our area. The Plasmid Finder database was run to obtain the information shown in **table 3.22**.

Table 3.22. Plasmid incompatibility groups detected in the 237 *K. pneumoniae* isolates

Plasmid Incompatibility group	Nº of <i>K. pneumoniae</i> isolates
Col(IMGS31)	1
Col(pHAD28)	1
Col156	1
Col3M	1
ColRNAI	42
IncFIB	191
IncFII	55
IncFIA	2
IncL	108
IncR	55
IncN	10
IncQ	13
IncX	8

Short-read sequencing of 205 isolates revealed 13 plasmid replicon types. At least two different incompatibility groups were identified in most of the tested isolates (195/205). The highest number of incompatibility groups (n=7) was detected in four isolates (3 from ST11 and 1 from ST437).

IncFIB and IncL replicons were the most common, each present in 93% and 53% of the isolates, respectively, followed by IncFII (27%) and IncR (27%).

In **table 3.23**, the most common patterns of plasmid incompatibility groups with certain β -lactam genes are shown and in **table 3.24** all the incompatibility groups detected for each STs are specified. In the case of ST101, ST147 and ST307 only one replicon pattern is shown, whereas ST11 shows more variability with three different patterns.

Table 3.23. Most frequently observed plasmid types and resistance genes

ST	No. replicons	FII replicons	Non-FII replicons	β -lactam resistance genes	No. of isolates
101	2	0	2	<i>bla</i> NDM-1, <i>bla</i> OXA-48, <i>bla</i> OXA-1, <i>bla</i> CTX-M-15, <i>bla</i> DHA-1, <i>bla</i> SHV-11	34
11	5	IncFII	4	<i>bla</i> CTX-M-1, <i>bla</i> OXA-48, <i>bla</i> SHV-11	26
11	1	0	1	<i>bla</i> OXA-1 <i>bla</i> DHA-1 <i>bla</i> SHV-11	8
11	3	IncFII	2	<i>bla</i> OXA-1 <i>bla</i> DHA-1 <i>bla</i> SHV-11	13
147	2	0	2	<i>bla</i> CTX-M-9 <i>bla</i> SHV-12	5
307	3	0	3	<i>bla</i> OXA-1, <i>bla</i> OXA-48, <i>bla</i> TEM-1, <i>bla</i> SHV-100, <i>bla</i> CTX-M-15	82
Others	1	0	1	<i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> OXA, <i>bla</i> TEM	34

Table 3.24. Incompatibility groups detected according to the different STs

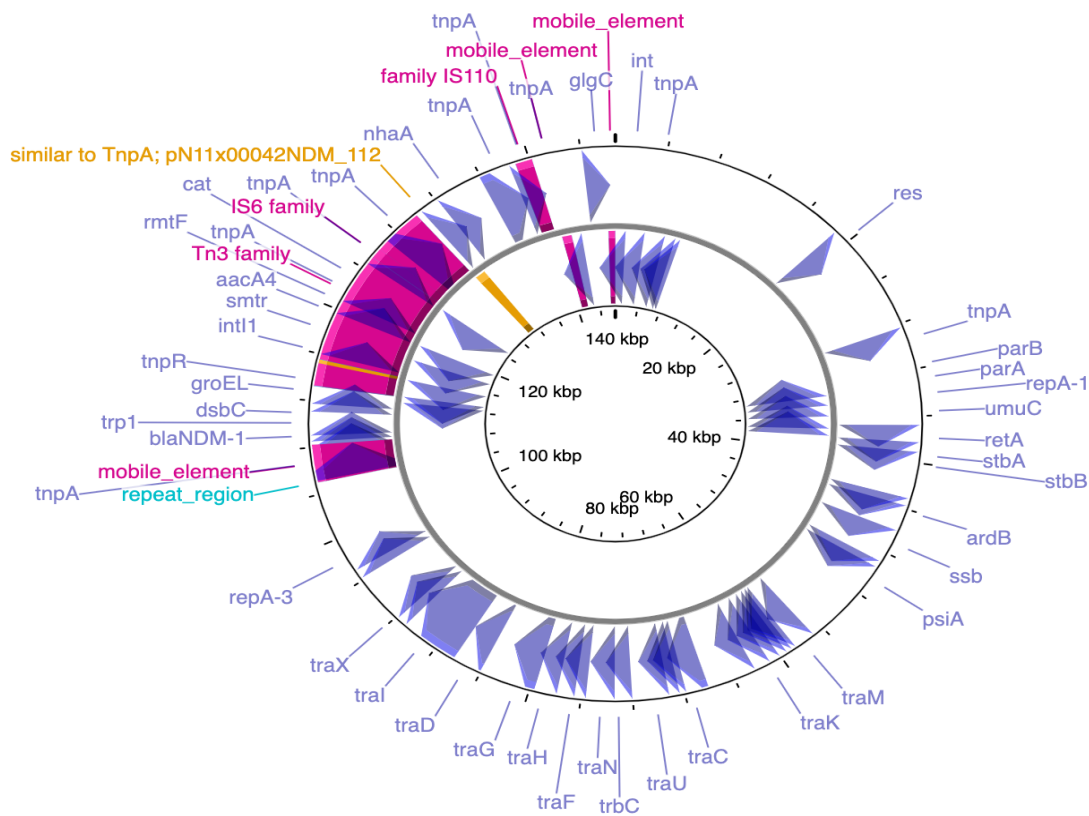
ST	Inc groups detected
11	ColRNAI, ColPVC, IncF, IncL, IncR, IncQ, IncX
13	ColRNAL, IncFIB, IncQ
14	IncFIB, IncFII
15	ColPVC, IncFIB, IncFII, IncQ, IncHI1, IncL, IncR, IncX
17	Col156, IncFIA, IncFIB, IncL, IncR, IncFII
23	IncHI1
33	Col(IMGS31), IncI1, IncFIB, IncR
37	ColRNAI, IncFIB, IncFII
101	IncFIB, IncL
107	-
147	IncFIB, IncHI2, IncL, IncR
252	IncFIB, IncFII, IncL
307	IncFIB, IncL
437	IncFIB, IncFII, IncL, IncN, IncR
896	IncL, IncR
1081	IncFIB
1082	IncFIB
1564	IncFIB
2457	IncFIB

7.1.2. Plasmid annotation

Plasmid annotation was performed using PROKKA as previously described. The plasmids were selected for annotation according to the resistance genes of interest and the different STs. One isolate producing *bla_{OXA-48}* belonging to ST307 and another one producing *bla_{NDM-1}* and belonging to ST101 were selected for plasmid analysis.

The data on plasmid features in this study comes from short-read whole-genome sequencing, lacking the information required to close the plasmid. For graphical annotation (figures 3.18, 3.19 and 3.20), plasmids like those in our study were used.

BLAST analysis of the *K. pneumoniae* plasmids identified in this study showed that the plasmids analyzed were similar to previously reported plasmids in the NCBI sequence database.



Klebsiella pneumoniae bla_{NDM-1} ST101

Figure 3.18. Graphical annotation of an IncF-type plasmid harboring *bla_{NDM-1}*

A circular version of the plasmid, which is an IncF-type, is found in Figure 3.18. The resistance genes found were *bla_{NDM-1}*, *rmtF* (codifying a methylase) and *aacA4* (codifying an acetylase). Insertion sequences detected were IS6 and IS110 family. Integrons, resolvases and recombinases/integrases are also shown with their orientation (direction of arrow), synteny and immediate environment. Other genes with unknown functions are hidden to make image less cluttered. This plasmid mapped 97% of *Klebsiella pneumoniae* strain N11-0042 plasmid pKp11-42 (KF295829.1).

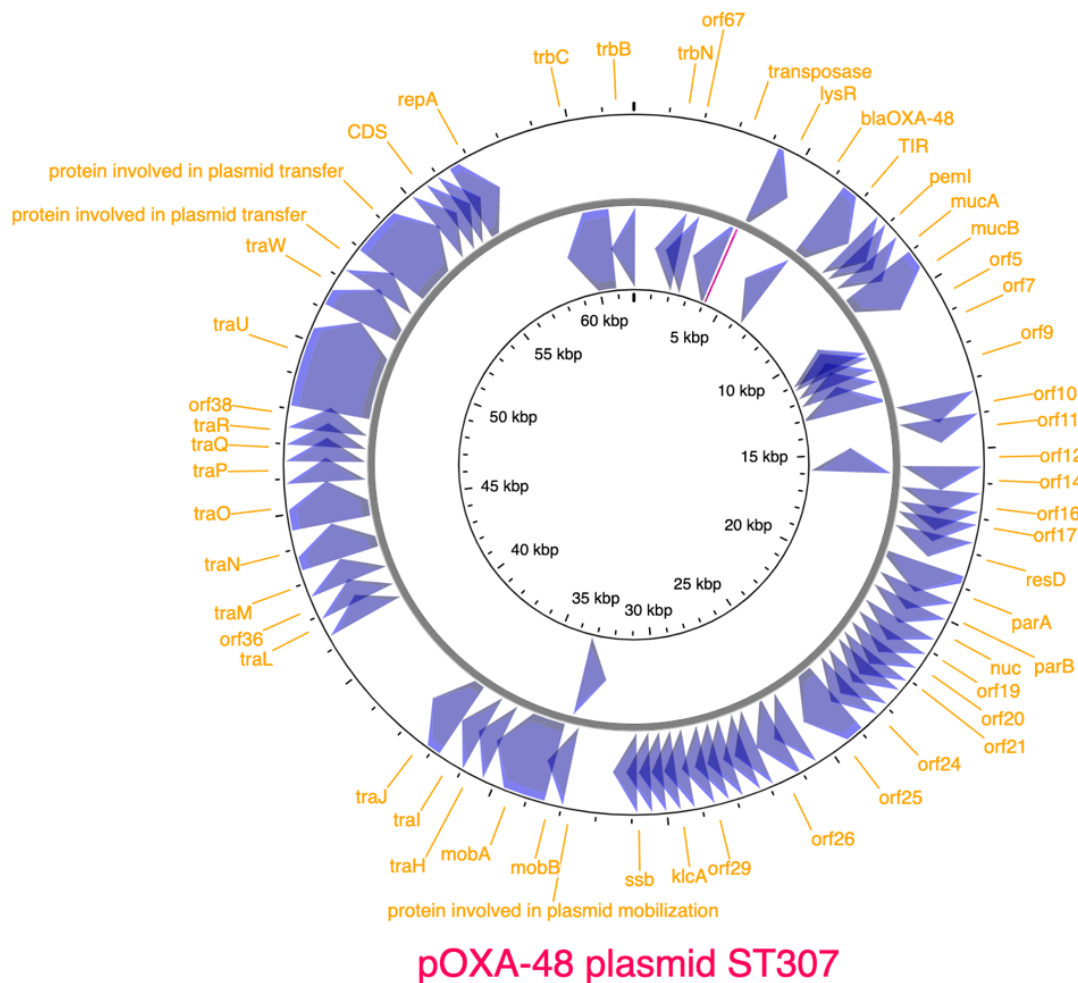


Figure 3.19. Graphical annotation of an IncL/M plasmid harboring *bla_{OXA-48}*

A circular version of the IncL/M plasmid is shown in **figure 3.19**. The only resistance gene found was *bla_{OXA-48}*. Remarkable features on the plasmid are shown with their orientation, synteny

and immediate environment. Other genes with unknown functions are hidden to make the image less cluttered. This plasmid mapped 100% of *Klebsiella pneumoniae* strain KP11978 plasmid pOXA-48 (JN626286.1).

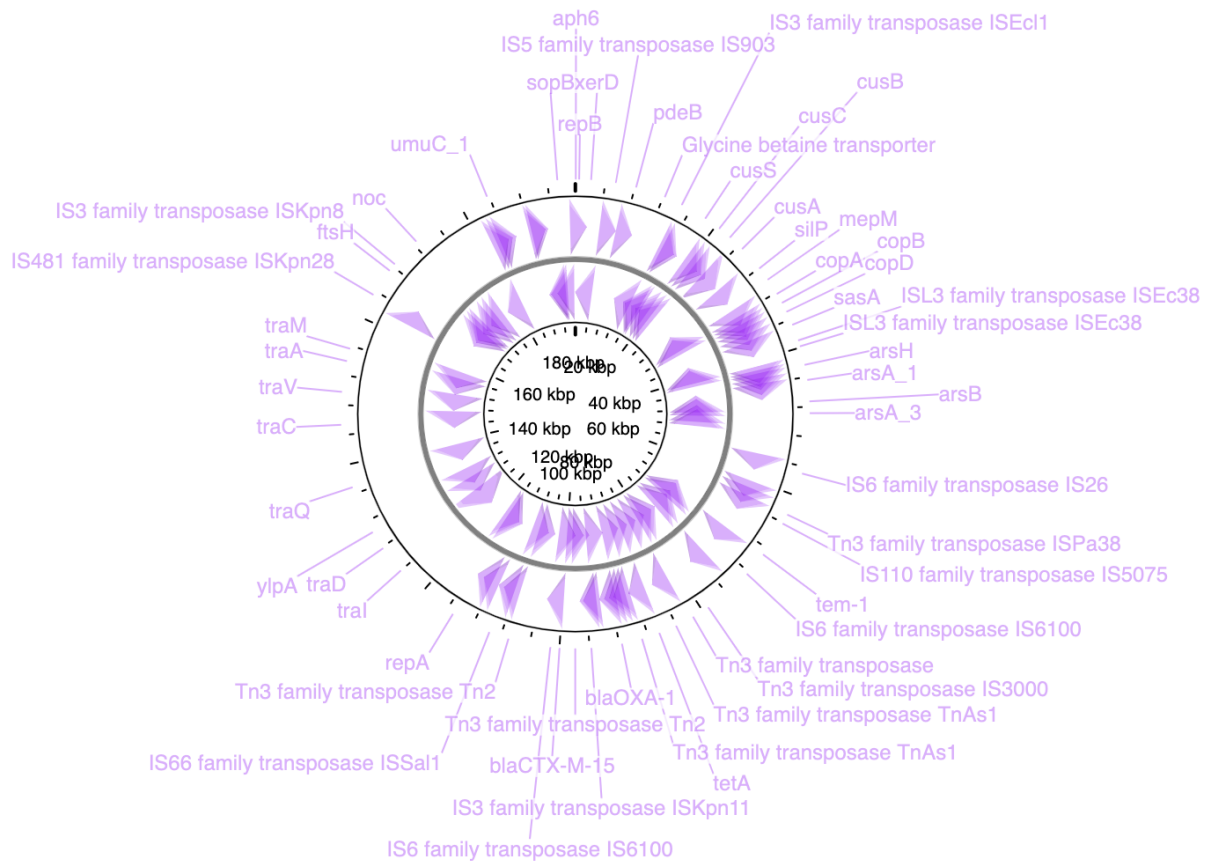


Figure 3.20. Graphical annotation of an IncF-type plasmid

A circular version of the plasmid is shown in **figure 3.20**. The resistance genes found were *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}, *catB3*, *dfrA14*, *aac6'lbcr*, *aph-6*, *aac4*, *tetA*, *tetR*, *sul2* and *qnrB1*. Insertion sequences and transposases are also shown with their orientation (direction of arrow), synteny and immediate environment. Other genes with unknown functions are hidden to make image less cluttered. This plasmid mapped 94% of *Klebsiella pneumoniae* strain E16KP0204 plasmid pE16KP0204-1 (CP052298).

7.2. Conjugation assays

Selected carbapenemase-encoding plasmids harboring *bla*_{OXA-48} were successfully transferred to a reference strain of *Escherichia coli* J53 azide-resistant. The OXA-48-carbapenemase-producing transconjugants expressed resistance to amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam and ertapenem. Unlike its parental strain, they did not show resistance to cefepime, ceftazidime, sulfamethoxazole, levofloxacin, ciprofloxacin, gentamycin and tobramycin. Those results agreed with the resistome carried by the pOXA-48 plasmid described below. The NDM-1 carbapenemase-producing transconjugant showed resistance to cephalosporins, amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, imipenem, meropenem, ertapenem, tobramycin, amikacin and gentamycin. Unlike its parental strain, they were susceptible to levofloxacin and ciprofloxacin. Genotypic confirmation of the selected carbapenemase-positive strain transconjugants was performed by isothermal amplification as previously described. In **table 3.25**, MICs of the transconjugant, the original strain and *E. coli* J53 are shown.

Table 3.25. MICs of the different strains involved in conjugation assays

Antibiotic	MIC original strain KP261	MIC transconjugant TC261	MIC original strain KP59	MIC transconjugant TC59	MIC <i>E.coli</i> J53
Ampicillin	>16	>16	>16	>16	≤8
Piperacillin	>16	>16	>16	>16	≤8
Ticarcillin	>16	>16	>16	>16	≤8
Amoxicillin clavulanate	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	≤8/4
Piperacillin tazobactam	>64	>64	>64	>64	≤8
Cefuroxime	>16	≤8	>16	>16	≤8
Cefoxitin	≤8	≤8	>16	>16	≤8
Cefotaxime	>16	>16	>16	>16	≤1
Ceftazidime	>8	≤1	>8	>8	≤1
Cefepime	>16	≤1	>16	>16	≤1
Aztreonam	≤1	≤1	NT	NT	≤1
Ertapenem	>1	1	>1	>1	≤0.5
Imipenem	2	2	>8	>8	≤1
Meropenem	≤1	≤1	>8	>8	≤1
Gentamycin	>4	≤2	>8	>8	≤2
Tobramycin	>4	≤2	>8	8	≤2
Amikacin	≤8	≤8	>32	>32	≤8
Ciprofloxacin	>1	≤0.5	>1	≤0.5	≤0.5
Levofloxacin	>1	≤1	>1	≤1	≤1
Fosfomycin	>64	≤32	≤32	≤32	≤32
Sulfamethoxazole	>32	≤2/38	≤2/38	≤2/38	≤2/38
Colistin	≤2	≤2	≤32	≤2	≤2

NT: Not tested;

8. Epidemiological relationship and outbreak investigation

Investigation of a presumed *K. pneumoniae* epidemic requires the performance of a molecular method such as pulse-field gel electrophoresis (PFGE), MLST or genome sequencing. In this study, we analyzed a group of isolates that were somehow related (antibiogram, resistance genes, hospital ward, etc.).

8.1. Pulse-field gel electrophoresis

Macro-restriction analysis was performed to 150 out of the 237 CRKP isolates with *Xba*I restriction enzyme. These 150 isolates were suspect of being related (time and/or location), and the analysis revealed 19 different profiles, which were grouped into 15 PFGE clusters. The predominant clusters were clone A (n=22) corresponding to ST101, clone B1 (n=22) and B2 (n=27), both belonging to ST11 but unrelated according to Tenover's criteria (more than 7 band differences) (1), and clone C1 (n=37) and C2 (n=22) belonging to ST307, which were possibly related according to band differences (4 band differences). The remaining PFGE clusters contained fewer than 4 isolates. In **figure 3.21**, different band patterns can be observed, and in the table below (**table 3.26**), all the clones detected after performing PFGE are also shown.

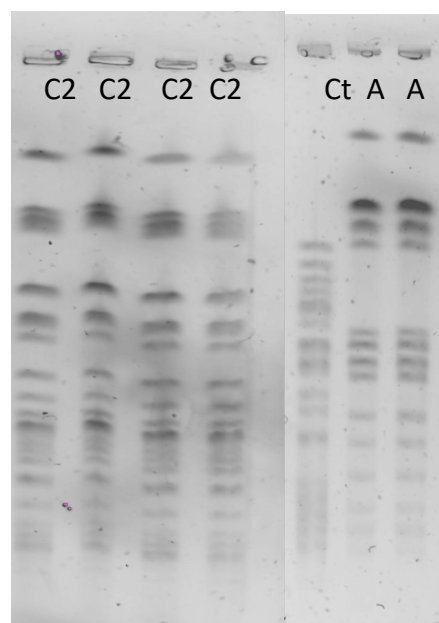


Figure 3.21. Different band patterns obtained after PFGE
Ct (Control strain: ATCC 25922 *Escherichia coli*)
C2 = Clone C2; A= Clone A

Table 3.26. Clones detected in 150 CRKP isolates

Clone	Sequence-type	Nº of isolates
A	101	22
B1	11	22
B2	11	27
C1	307	37
C2	307	22
D1	437	3
D2	437	2
E	405	1
F	37	2
G1	2457	1
G2	2457	1
H	1082	2
I	13	1
J	107	1
K	147	1
L	17	1
M	33	1
N	449	1
Ñ	Unknown	2

DNA banding patterns were analyzed using Bionumerics software, version 7.6. The Dice coefficient was chosen to calculate pair-wise similarities, and the unweighted pairwise grouping with mathematical averages (UPGMA) algorithm was chosen to construct dendrograms. Both position tolerance and optimization were set at 1%. Similarities higher than 85% were accepted as same PFGE types. In **figure 3.22**, a dendrogram of three different clones: A, B1 and C2. The blue line shows the cut-off established (85%). No relationship is found between the three different clones.

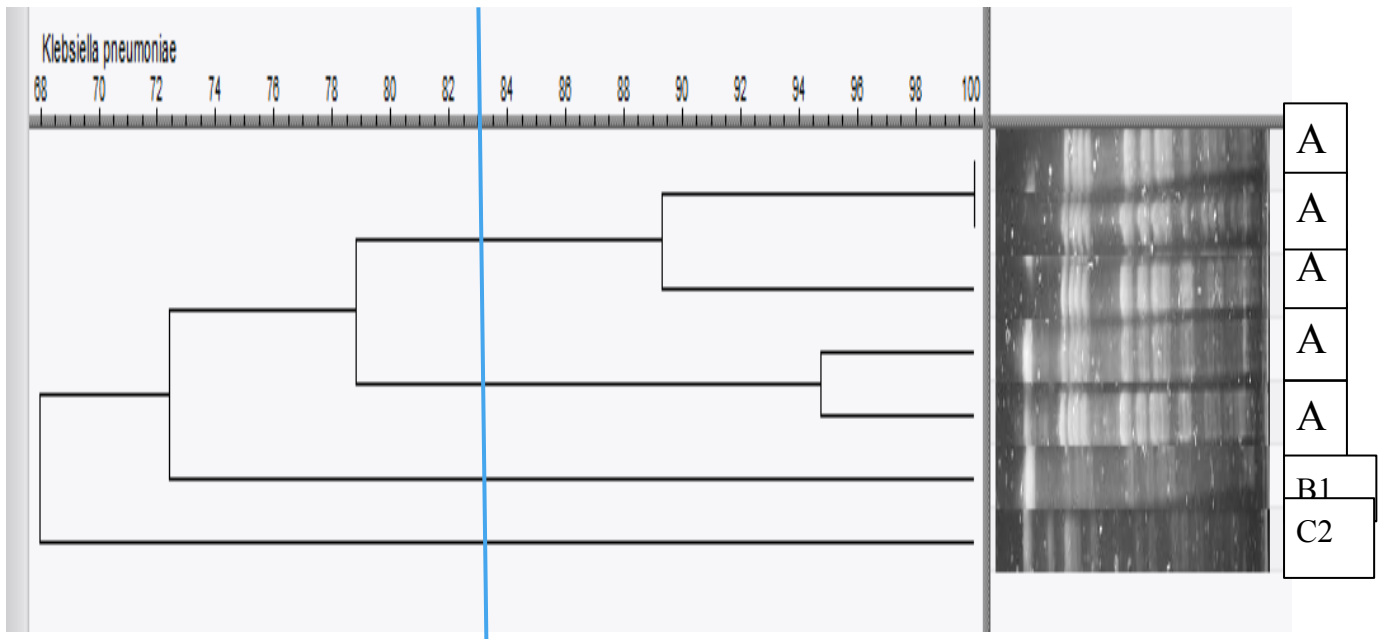


Figure 3.22. Dendrogram obtained with Bionumerics software, version 7.6

8.2. Epidemiological relationship and outbreak investigation

After obtaining the results of the macro-restriction analyses, the investigation of the possible outbreaks was focused in the 7 clones that had been more frequently detected: A (ST101), B1 (ST11), B2 (ST11), C1 (ST307), C2 (ST307), D1 (ST437) and D2 (ST437). Information from hospital ward distribution, year of isolation, etc. was collected from the laboratory database and the clinical record of the patients. WARD 1, WARD2, WARD3 and WARD4 are the same hospital wards for all the clones investigated.

Clone A (ST101):

A total of 22 strains belonging to this clone were isolated from 2015 until 2017, showing a clear peak during 2016 (see **figure 3.23**). Ten out of the 22 samples were obtained from surveillance culture, 11 were urine samples from patients carrying a urinary catheter and the last one was a blood sample from a patient with sepsis.

Regarding resistance traits, all the strains belonging to this clone were carbapenemase producers. They all harbored *bla*_{CTX-M-15} and either *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1} or both.

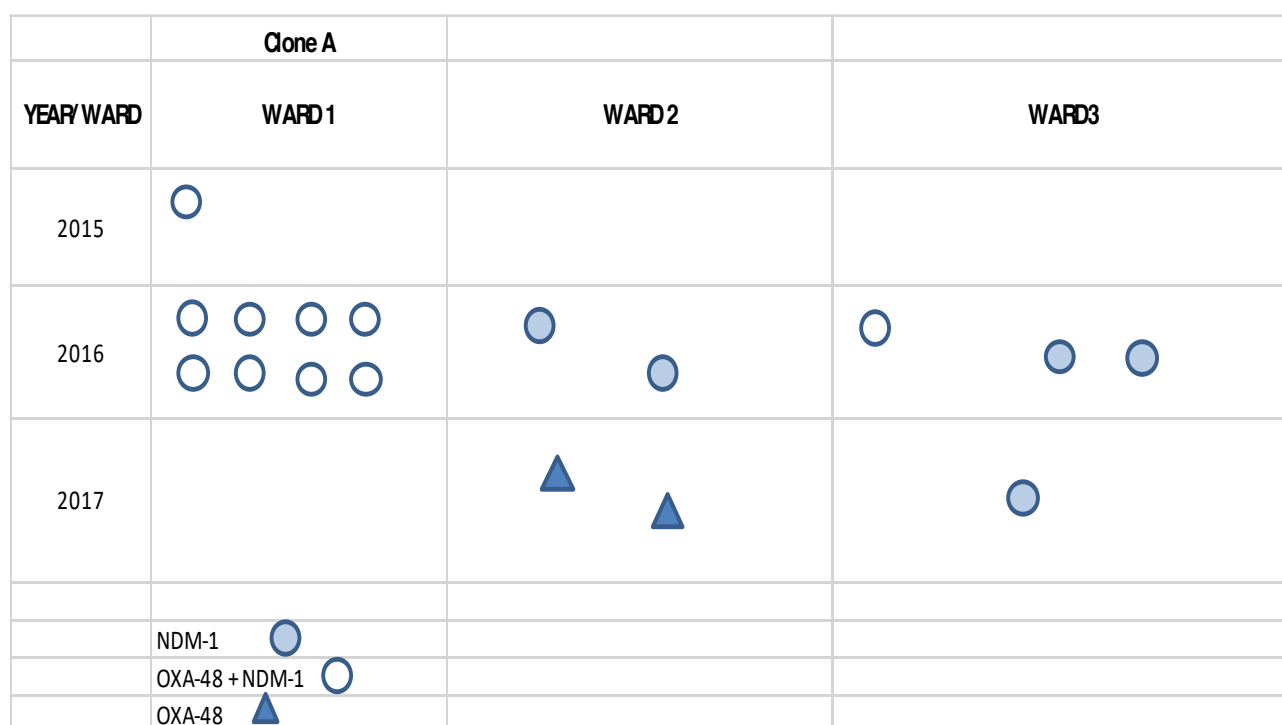


Figure 3.23. Dissemination of Clone A throughout the years and the different wards

Almost half of the strains belonging to this clone were isolated in the same ward (WARD1) and especially during 2016. WARD2 and WARD3 had other few isolates during 2016 and 2017. There is a narrow relationship between the three wards, meaning that a lot of patients move between them. It was not possible to show epidemiological relationship among 5 out of the 22 strains that belonged to this clone, and they are not depicted in Figure 3.23. Later on, in 2018, another strain belonging to ST101 was isolated from a urinary sample of a patient carrying a urinary catheter and who had been in WARD1 in 2016. Patient zero hypothetically would have entered WARD1 in December 2015 and from there the spread of this clone would have started.

After performing NGS to all the samples, a maximum likelihood phylogenetic tree was built for each major sequence-type.

In the case of ST101, the tree scale obtained (n° of SNPs/n° of total positions used) is very small. This means that there are not big differences between the strains even though in the tree different branches can be seen. These results clearly correspond to those obtained from PFGE, with only one clone for this specific sequence-type. In **figure 3.24**, the phylogenetic tree is shown.

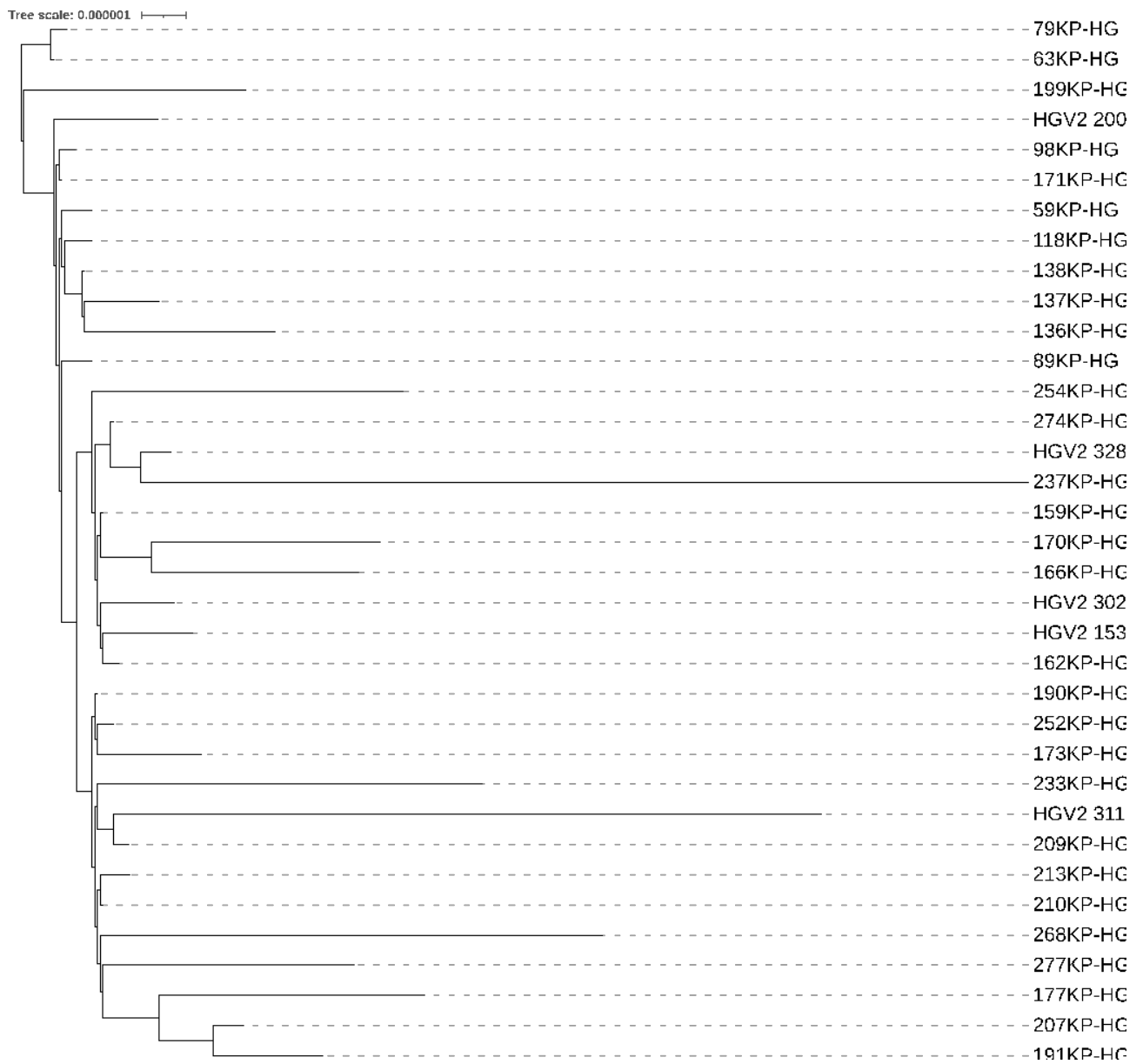


Figure 3.24. Phylogenetic tree of ST101 (Clone A)

Clone B1 (ST11):

A total of 22 strains belonging to this clone were isolated from 2015 until 2017 (see **figure 3.25**). Fourteen out of the 22 samples were obtained from surveillance culture, and 8 were urine samples from patients carrying a urinary catheter.

Regarding resistance traits, all the strains belonging to this clone were AmpC β -lactamase *bla*_{DHA-1} producers. Half of the strains belonging to this clone were isolated in the same ward (WARD2) during the same year. During the following years 5 more isolates were found in WARD1 and WARD2. Seven strains belonging to this clone could not be epidemiologically related and they are not present in **figure 3.25**.






	Clone B1	
YEAR/WARD	WARD 1	WARD 2
2015		
2016		
2017		
	DHA-1 	

Figure 3.25. Dissemination of Clone B1 throughout the years and the different wards

Clone B2 (ST11):

A total of 27 strains belonging to this clone were isolated from 2015 until 2017 (see **figure 3.26**). Fifteen out of the 27 samples were obtained from surveillance culture, 9 were urine samples, one sputum, one catheter and one wound exudate. Regarding resistance traits, 20 of the isolates were OXA-48 producers, whereas the other 7 were DHA-1 producers. Again, the highest concentration of this clone appears in WARD2, especially during 2017. Six strains belonging to this clone could not be epidemiologically related and they are not present in **figure 3.26**.


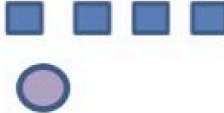


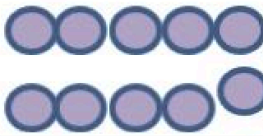



	Clone B2		
YEAR/WARD	WARD 1	WARD 2	WARD 3
2015			
2016			
2017			
	OXA-48 + CTX-M-15 		
	DHA-1 		

Figure 3.26. Dissemination of Clone B2 throughout the years and the different wards

In **figure 3.27** the phylogenetic tree corresponding to ST11 is shown.

In the case of ST11, the tree scale obtained (n° of SNPs/n° of total positions used) is also small. However, two well-differentiated clades (or clones) (B1 and B2) can be seen in the tree circled, together with other two isolates that are related to one of the clades but don't belong to it. These findings also coincide with results from PFGE, with two clones detected for this specific sequence-type.



Figure 3.27. Phylogenetic tree of ST11 (Clone B1 and B2)

Clone C1 (ST307):

A total of 37 strains belonging to this clone were isolated from 2015 until 2017 (see **figure 3.28**). Seventeen out of the 37 strains were obtained from surveillance culture, 16 were urine samples, one blood from a patient with sepsis and two sputa. Regarding resistance traits, all the isolates belonging to this clone were OXA-48 producers. This is the biggest outbreak reported in our settings to the moment, with 29 out of the 37 isolates epidemiologically related. Again, WARD2 contains the highest prevalence of this clone, with 14 isolates from 2015 to 2017, but this isolate is also present in WARD1, WARD3 and WARD4 throughout the years.

	Clone C1			
YEAR/WARD	WARD 1	WARD 2	WARD 3	WARD 4
2015				
2016				
2017				
	OXA-48 + CTX-M-15			

Figure 3.28. Dissemination of Clone C1 throughout the years and the different wards

Clone C2 (ST307):

A total of 23 strains belonging to this clone were isolated from 2015 until 2017 (see **figure 3.29**). Fifteen out of the 23 strains were obtained from urine samples, whereas 7 were obtained from surveillance culture and one from a wound exudate. Regarding resistance traits, all the isolates belonging to this clone were OXA-48 producers. Sixteen out of the 23 isolates are epidemiologically related, with WARD3 being the one with more isolates throughout the years.

	Clone C2		
YEAR/WARD	WARD 1	WARD 2	WARD 3
2015			1
2016	2		5
2017	1	3	5
	OXA-48 + CTX-M-15		

Figure 3.29. Dissemination of Clone C2 throughout the years and the different wards

In **figure 3.30**, the phylogenetic tree corresponding to ST307 is shown. Again, the tree scale obtained (n° of SNPs/ n° of total positions used) is also really small. However, two clades are also found (both circles shown in the figure) although very closely related between them. This also coincides with results from PFGE because the number in band differences is 4, which means that they are possibly epidemiologically related, according to Tenover's criteria.

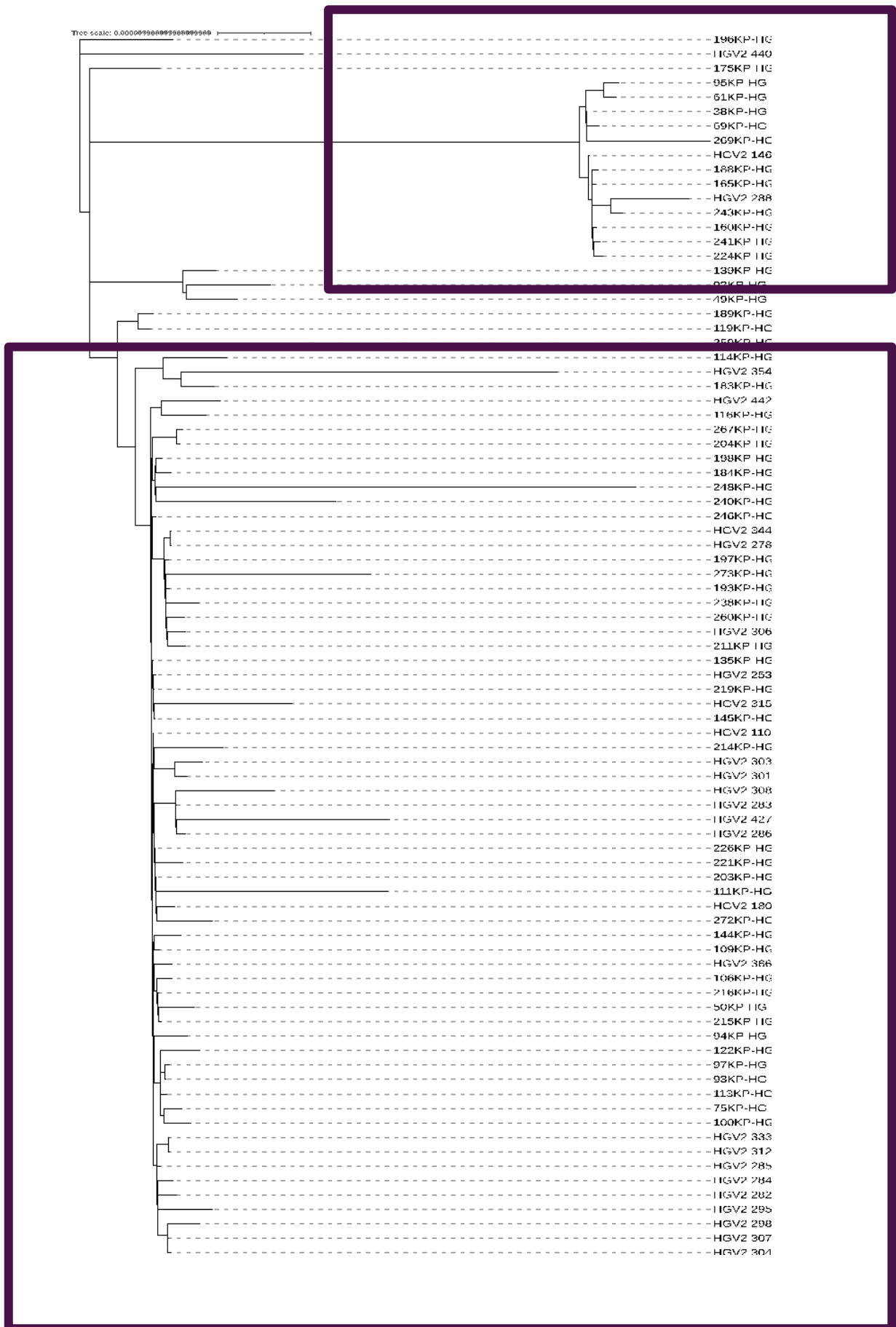


Figure 3.30. Phylogenetic tree of ST307 (Clone C1 and C2)

Clones D1 and D2 (ST437):

Regarding clone D1, all three isolates were obtained from surveillance culture and were collected from the same ward (WARD2) during 2016, being OXA-48 producers. In the case of clone D2, there is no epidemiological relationship between the two isolates.

After analyzing the seven potential outbreaks, epidemiological relationship showed a high prevalence of these clones in the hospital settings throughout the years, specially concentrated in three wards (WARD1, WARD2 and WARD3). During 2015, most of the isolates belonging to these clones were *bla*DHA-1 carriers, whereas only a minority of the strains was carbapenemase producers. However, at some point in 2016, *bla*OXA-48 and *bla*NDM-1 start to be predominant and substitute *bla*DHA-1. There were also isolates coming from the community but in a lesser extent than those related to hospital wards.

Even though not all the isolates underwent PFGE, they were later included in a phylogenetic tree after performing NGS. In the figure below (**Figure 3.31**), it is easier to clearly appreciate the outbreaks present in our study. A different color has been assigned to each sequence-type. In this tree it can be clearly seen that there is only one clone belonging to ST101, ST307, ST437, whereas two different but related clones are found for ST11.

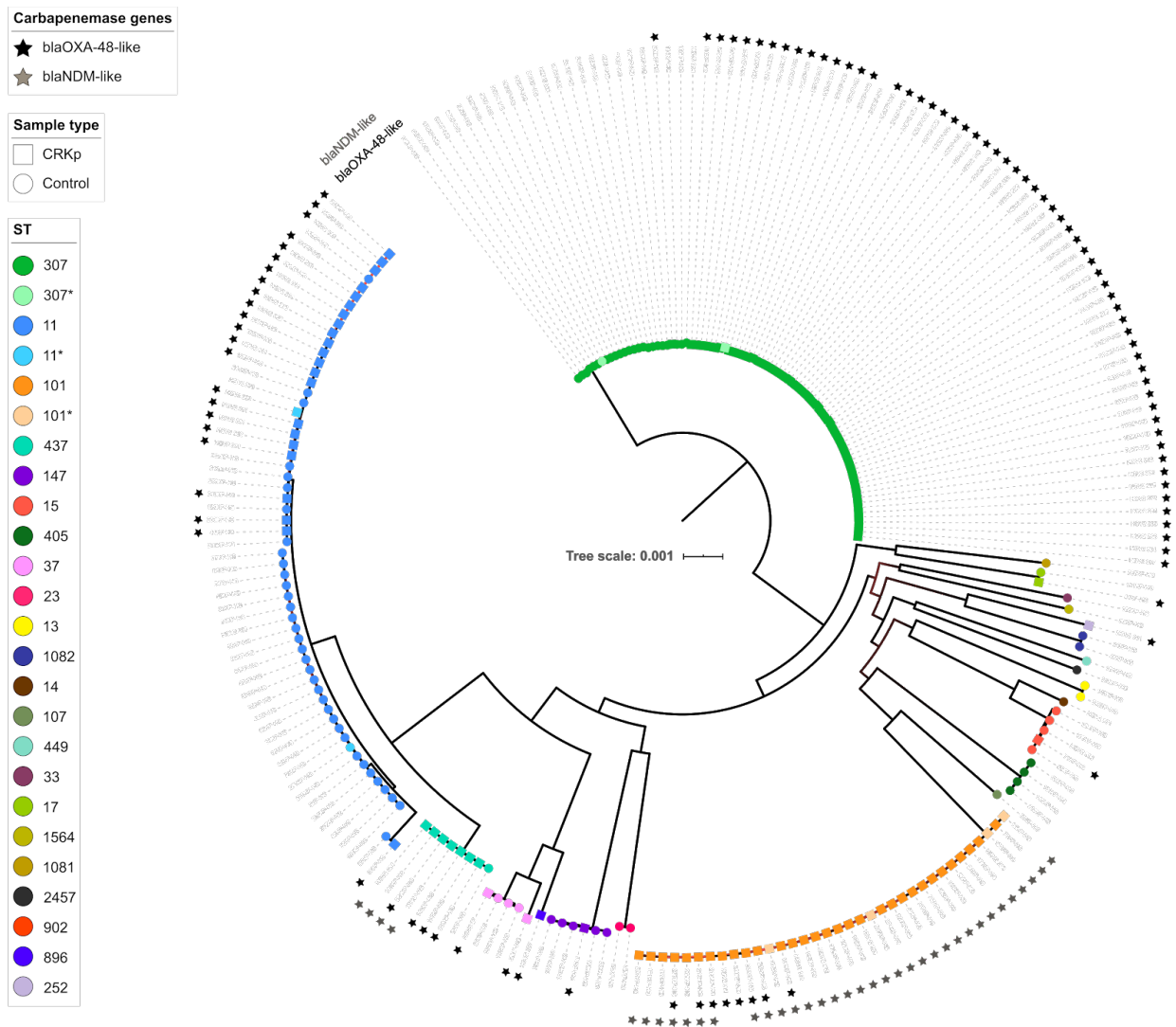


Figure 3.31. Maximum likelihood tree reconstructed from the whole genome alignment comprising 3,579,904 nucleotide positions from which 125,247 are variable sites. Controls are represented as circles and carbapenem-resistant isolates as squares. Circles and squares are filled by ST colors. The presence of carbapenemase genes is shown outside the tree with black stars for *bla*OXA-48-like genes and grey stars for *bla*NDM-like genes.

V. Discussion

K. pneumoniae is an important pathogen causing different infections worldwide and its epidemiology has been broadly studied in hospital settings, being associated to dissemination of multidrug-resistant strains (207-210). The incidence of infections due to carbapenem-resistant Enterobacterales is rapidly rising, posing a major challenge to public health globally (211). Indeed, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP), the most clinically significant member of carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE), was recently highlighted as the fastest-growing resistance threat in Europe in terms of number of infections and attributable deaths (212). In fact, the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) had estimated that 25,000 people may die each year from infections related to antimicrobial resistance (213).

The dramatic increase in prevalence of infections caused by these MDR and XDR microorganisms poses a great concern, since these pathogens are common natural inhabitants of our microbiome (214). Besides multiresistance, *K. pneumoniae* is a frequent causative agent of nosocomial infections such as urinary tract infections, wound infections, bloodstream infections, etc. (215,216). Moreover, in the community, *K. pneumoniae* is the second most frequent agent causing urinary tract infection (217) and it's known to colonize the human gastrointestinal tract and oropharynx mucosal surfaces (218).

1. Demographics and clinical features

In this study, more than 80% of the isolates were recovered from hospitalized patients, which shows that CRKP infection and/or colonization is more likely to be nosocomial than community-acquired, as it has already been described in the literature (56). Besides, 38% of the samples were obtained from surveillance culture, meaning that the patients got colonized by these microorganisms during their hospital stay. Most of the samples coming from the community were urinary samples, as previously described (19).

Regarding the age of the patients, more than 60% were over the age of 70, while the rest of the patients were under 69 years old. No patients under 15 suffered an infection and/or colonization by *K. pneumoniae*, also coinciding with previous studies (19).

Regarding the clinical features of the patients in the study, suffering a CRKP infection was more likely when patients had previous hospital stays, previous antimicrobial therapy, if they underwent surgery or had a surgery complication, if patients carried urinary catheter and if patients had chronic renal or pulmonary disease ($p < 0.05$). However, other risk factors such as uropathology and cirrhosis were not statistically significant probably due to the low number of patients. Previous exposure to fluoroquinolones, third generation cephalosporins and colistin are also described as risk factors for MDR infections in the literature together with those factors that were actually statistically significant (161,219-221).

2. *Klebsiella pneumoniae* population structure and resistome

The genomes of the isolates ranged from 5.3 Mb to 5.5 Mb, with more than 100 contigs for each strain, and a mean GC content of 58%.

We defined phylogenetic lineages by their multi-locus sequence-type. Carbapenemase-positive isolates are concentrated in the major clonal lineages of *K. pneumoniae* (161), which are ST11, ST15, ST101 and ST258. However, although we detected ST11, ST15 and ST101 in our study, we did not detect any ST258, having instead a high percentage of the isolates belonging to ST307. An analysis of the molecular epidemiology of these isolates confirmed the global dissemination of specific STs.

The major burden of AMR is due to the global spread of certain successful AMR clones (referred to as high-risk, epidemic, eminent or problem clones) and/or the movement of AMR genes between diverse clones (222). Interestingly, the susceptibility profiles were found to be strictly related to the sequence-type of each strain.

Non-susceptibility to any carbapenem was the main inclusion criterion for this study. All the isolates showed non-susceptibility to ertapenem, but showed variable susceptibility to imipenem and meropenem, depending on the strain and the carbapenemase gene they harbored.

Susceptibility testing of all the strains showed really high resistance rates to β -lactam antibiotics as expected. Since the introduction in clinical medicine of β -lactam antibiotics in 1940s, hundreds of β -lactamases have evolved among enteric pathogens including *K. pneumoniae*, reaching an astonishing number (>2000) and diversity (223). In our study, several β -lactam resistance genes were detected: *bla*_{AmpH} in all the isolates, followed by *bla*_{SHV} (97%), *bla*_{OXA-1} (81%), *bla*_{CTX-M} (60%) and *bla*_{TEM} (46%). The most prevalent carbapenemase detected by both PCR and NGS was *bla*_{OXA-48} (50%), followed by *bla*_{NDM-1} (16%). Co-production of *bla*_{OXA-48} and *bla*_{NDM} was found in 7 isolates, being described for the first time in our area. In fact, our study group conducted an outbreak investigation that included 14 patients infected and/or colonized by two different clones

of *bla*_{OXA-48} and *bla*_{NDM} co-producing *K. pneumoniae* (224). However, no *bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} and/or *bla*_{VIM} were detected, unlike results from other studies undergone in Europe (16).

A new resistance gene belonging to *bla*_{NDM} family was described for the first time in this study: *bla*_{NDM-23} was found in three isolates belonging to ST437, but no epidemiological relationship was found between the patients. This gene was harbored in a plasmid lacking a relaxase (IncFIB-type), and thus being unable to conjugate and spread to other microorganisms horizontally.

*bla*_{OXA-48}-containing isolates were mainly resistant to ertapenem and showed variable resistance rates to imipenem and meropenem. By contrast, all isolates harboring *bla*_{NDM-1} were resistant to carbapenems. This has already been widely described in the literature (225). Evidently, NDM-positive strains had higher carbapenem resistance than OXA-48-producing strains. Although isolates containing both *bla*_{OXA-48} and *bla*_{NDM-1} genes (KP190, KP210, KP213, KP233, KP252, KP262, KP277) were also highly resistant, they did not have a higher MIC than those with only *bla*_{NDM}, which could be due to the possible lack of expression and/or synergy of both genes. Remarkably, the strains harboring the new *bla*_{NDM-23} showed susceptibility to imipenem and meropenem.

Co-resistance to non-β-lactam antimicrobial agents was also found in most of the multi-drug resistant *K. pneumoniae* isolates: More than 90% were resistant to fluoroquinolones, harboring different genes involved in conferring resistance to this antimicrobial family. According to ECDC data, 25% of *K. pneumoniae* strains in Spain show resistance to fluoroquinolones (226), although these data do not specify if the isolates were MDR. The mechanism of *K. pneumoniae* resistance to fluoroquinolones mainly includes mutation of target genes, MDR efflux pump production and modification of enzymes and target protection proteins (227). The primary resistance mechanism is the mutation of DNA gyrase binding to the quinolone on the chromosome and topoisomerase IV, mainly *GyrA* and *ParC* (228,75). In our study, almost 50% of the strains had mutations in both genes. Studies have reported as well that changes in cell permeability in *K. pneumoniae* are also involved in quinolone resistance, mainly including *OmpK36* deficiency (229) and an efflux pump from *OqxAB*, originally thought to derive from chromosome, which has now been shown to be

involved in plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR). Both mechanisms were present in more than 90% of our strains, contributing to the high percentage of resistance found in our isolates.

Another class of quinolone resistance includes the PMQR determinants, considered to be one of the key factors mediating fluoroquinolone resistance in *K. pneumoniae* (230,231). These genes contain the *qnr* gene, which encodes a protein family that protects DNAgyrase and topoisomerase IV from the inhibition of quinolone. Another PMQR gene, *aa(6′)-Ib-cr*, is considered as the only gene in *K. pneumoniae* responsible for quinolone modification (232). Originally, it was found to be encoded by the plasmid of *K. pneumoniae*, but recently was also found on chromosomes as well. Although plasmid-encoded resistance genes cause by themselves low level resistance to quinolones, they can complement other chromosomal mechanisms causing higher level of resistance (233). PMQR genes were found in 50% of our strains, thus together with the previously resistance genes mentioned, show a really high prevalence of quinolone resistance in the strains of our study, coinciding with findings from the literature (234), which reveal the emergence of a high prevalence (50%) of *qnr* determinants in the isolates under study.

Regarding aminoglycosides, gentamycin and tobramycin were the ones showing higher resistance rates (around 70%). Through the years, *K. pneumoniae* has acquired antibiotic resistance mechanisms to aminoglycosides, including drug-modifying enzymes with diverse activities (adenylation, acetylation or phosphorylation). The reduced use of aminoglycosides slowed the evolution of the novel resistance genes until the 16S rRNA methylase appeared, belonging to the *ArmA* gene family, encoding an enzyme that blocks the binding of aminoglycosides to the 16SrRNA (235). Other known plasmids that mediate the activity of 16SrRNA methylases, including the *NpmA* and *Rmt* gene family have also been identified in *K. pneumoniae*, but there is still no evidence of chromosomal location (236). In our study, the 16S RNA methyltransferase *rmtF* was found in 28 of the isolates harboring *bla_{NDM-1}* and belonging mainly to ST101, and they were resistant to amikacin. This had already been described in a study by Poirel *et al* (237).

Among gentamicin- or amikacin-resistant *K. pneumoniae* strains, *aac(6′)-Ib* was considered to be the most widespread, followed by *aac(3′)-II*, *aph(3′)-V*, and *ant(3′′)-I* (239), which coincides with our results from genotype analysis.

Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole in gram-negative bacteria generally arises from plasmid-mediated acquisition of variants of these enzymes, which are then not inhibited by the drugs (83). Three plasmid-mediated DHPS genes encoding sulfonamide resistance, *sul1*, *sul2* and *sul3*, have been identified in gram-negative bacteria, and more than 30 *Dfr* genes encoding resistant variants to trimethoprim have been described. However, little is known about *sul* genes in *K. pneumoniae* (239). In our study, resistance of 75% was found to trimethoprim-sulfamethoxazole. In other studies, *sul1* gene was commonly found in *K. pneumoniae* (240), whereas in our study the most prevalent one was *sul2* (50% of the strains). Regarding *Dfr* genes distribution, *dfrA14* was the most prevalent one, followed by *dfrA12*, not coinciding with other studies where *dfrA1* was the most frequently detected gene (239).

The history of *K. pneumoniae* polymyxin resistance is shorter compared to other antibiotics, due to the limited use of this drug in the 1980s and 2000s. In the early 2000s, as more and more carbapenemase-producing extensively-drug resistant *K. pneumoniae* strains appeared, polymyxin became the last resource treatment used. The first nosocomial infection of polymyxin-resistant MDR *K. pneumoniae* was found in Greece in 2004 (241). Since then, there are more and more clinical reports on the emergence of polymyxin-resistant strains. In our study, most of the strains remained susceptible to this antimicrobial family. In fact, colistin turned out to be the antibiotic with the highest susceptibility rates (87%). The main mechanism of *K. pneumoniae* polymyxin resistance is target modification by chromosomal mechanisms, and among the genes involved, overexpression of *prnB* and inactivation of *mgrB* are sufficient to cause polymyxin resistance.

Recently, mobile colistin resistance has been identified (79). MCR-1 was first reported in late 2015 (242,243) and until 2020, researches have reported eight additional MCR family members (MCR-2 to MCR-9) (244). In the strains of our study, mobile colistin resistance determinants

(MCR-1 to 9) were not identified, although colistin resistance was recorded in 5 *K. pneumoniae* isolates, being involved chromosomal resistance mechanisms, as previously found in the literature (245). This fact implies no horizontal transfer of colistin resistance genes, which could explain why the isolates from our study were mostly susceptible to this antimicrobial agent.

A moderate resistance, around 50% was detected to tigecycline. Tigecycline is the first generation of glycylcycline (246), which has been used since 2005 to treat *K. pneumoniae* infection. It is a drug with broad-spectrum antibacterial activity and is effective even for ESBL-derived strains (247). Known tigecycline tolerance mechanisms are chromosomally encoded, including modifications of the 30S and 16S ribosomal unit targets, as well as changes in cell permeability. Studies have shown that overexpression of efflux pumps such as OqxAB can also lead to tigecycline resistance (248). OqxAB genes were detected in almost all the isolates in our study, but phenotypic resistance was variable. Decreased transcript levels of porin OmpK35 can also lead to enhanced resistance of *K. pneumoniae* strains (83), but no mutation for this porin has been detected in our strains. The tetracycline-resistant efflux pumps encoded by the *tetA* gene were found in non-susceptible *K. pneumoniae* isolates, but their mechanism of resistance to tigecycline remains unclear (249).

Regarding fosfomicin, it has been increasingly used to treat infections caused by MDR bacteria, especially those resistant to carbapenems (250). However, several mechanisms of fosfomicin resistance have been described, such as the modification of the fosfomicin binding target (*murA*) and the presence of genes encoding fosfomicin-modifying enzymes (*fosA*)(251). In the present study, almost all the strains harbored the *fosA* gene, but phenotypically turned out to be mainly susceptible to this antimicrobial agent. In a recent study conducted by Wang *et al.* (252), chromosomally-encoded *fosA* genes were found in both fosfomicin-resistant and fosfomicin-susceptible *K. pneumoniae* strains. However, they found that I91V *fosA* mutation was present in all the fosfomicin-resistant strains, which is until now the only mechanism underlying the fosfomicin

resistance in CRKP. In our study we did not search for this mutation, so further investigation will be needed to verify these findings.

Outer membrane proteins (OMP) or porins, expressed in the outer membrane of gram-negative bacteria, regulate the movement of substances such as antibiotics (253). *K. pneumoniae* produces two major non-specific porins, Ompk35 and Ompk36, which allow the passive diffusion of antibiotics like β -lactams and fluoroquinolones (254). The porin expression in clinical isolates of *K. pneumoniae* may be altered by factors such as point mutations or insertional interruptions in the coding sequences or the promoter region, and the strains lacking both OmpK35 and OmpK36 exhibit high levels of antibiotic resistance (255).

Worryingly, almost all these *K. pneumoniae* isolates co-harbored numerous other ARGs alongside extensive mutations in their OmpK36 genes, as already described in the literature (256), thus making them potentially multi- and extensively-drug resistant, an observation made in this and other previous studies (257,258).

Concordance between phenotypic and genotypic methods was not good for β -lactams in all cases. In 19 isolates, phenotypic detection methods failed to detect AmpC β -lactamase production, which was later confirmed either by PCR or NGS. Regarding concordance between resistance genes detected by PCR and those detected by NGS, in 8 cases *bla*_{DHA-1} genes were not detected by PCR and later identified by NGS. In the case of ESBL genes and carbapenemases, a 100% concordance was observed.

On the other hand, concordance between predicted antimicrobial susceptibility profile from genotype and phenotypic susceptibility profile was not good for β -lactams, aminoglycosides and tetracyclines. This has previously been observed in the literature, mainly because of the hydrolysis rates of the different carbapenemases, and also because of the gene expression rate for aminoglycosides and tetracyclines. Nowadays, these disagreement rates still remain a problem for inferring antimicrobial susceptibility profile from NGS (259).

3. *Klebsiella pneumoniae* virulome

The rich virulence genes and capsule repertoire of *K. pneumoniae* enable them to escape host immune forces (277). Regarding the capsule polysaccharide types based on the K-loci of *K. pneumoniae*, more than 79 have been described, but only K1 and K2 are associated with hypervirulent strains whilst the others are associated with classical strains of *K.pneumoniae* (27,263). Fortunately, no hypervirulence genes were found albeit capsule type K1, which was identified only in one strain in our study (KP225), harboring *bla*_{DHA-1} and characterized as K1 serotype. The strain KP225 belonged to ST23 (which belongs to clonal group 23), considered a highly virulent clone and an efficient colonizer of the human intestinal tract (278) and was found to be carrying an IncH1 plasmid type. Its resistance phenotype was supported by the identification of β -lactamases such as *bla*_{SHV-190} and *bla*_{DHA-1}; quinolone efflux pump *OqxA* and *OqxB*, and fosfomycin resistance gene *FosA* in the chromosome. This has been recently described in the literature (279,280). However, in our study, no other resistance determinants besides those mentioned above were found.

The highly clone-specific nature of the O and K capsule type suggest their conserved nature within the genome, contrary to the virulence genes which differed even within clones. The diversity of the virulence genes within clones from the same hospital setting suggest that they were mostly acquired horizontally rather than vertically and could be associated with plasmids. However, we were unfortunately unable to determine their mobility. Moreover, no association could be established between the specimen sources and the virulome or capsule types.

Hansen *et al* in 1999 (21) studied the diversity of capsule serotypes in different countries, finding in Spain a majority of O1 followed by O2 serotype, found also in most of our strains.

There was a strong relationship between a specific *wzi* sequence and a capsule type: for example, K102 which was the most prevalent capsular type had the *wzi* sequence 173. The only exception was *wzi*₂₄, found in capsular type K24 and K39. There was also a relationship between *K.*

pneumoniae different STs: ST101 corresponded always to K17 and *wzi*137. A variable ST was 11, with three different K types found: K105, K24 and K13, each with a different *wzi* sequence.

The most frequently detected virulence factors in our study were: yersiniabactin (in 44% of the strains), followed by aerobactin (detected in 7 strains belonging to ST11) and salmochelin (only detected in KP225). Among the STs harboring these virulence factors, the well-known high-risk clones (ST101, ST437, ST11, etc.) were found, and no sample-type relationship could be established. Findings in other studies show that multi-drug resistance and hypervirulent populations of this species are largely non-overlapping, which coincides with our results (281).

However, *K. pneumoniae* permeability to mobile genetic elements is a key factor for its dissemination, not only regarding the possibility of becoming resistant to antibiotics, but also evolving towards more virulent phenotypes thanks to genes that may provide a survival benefit to microorganisms (282).

4. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae mobilome*

Genes encoding these carbapenemases are usually located on plasmids which can transmit vertically along clonal lineages as well as horizontally between different strains and species (88). Within plasmids, carbapenemase genes are also frequently associated with smaller mobile genetic elements such as transposons and mobile gene cassettes inserted into integrons, extending their recombinatory capability to multiple nested levels (260).

Very often multiple physically linked genetic determinants, conferring resistance to different classes of antibiotics can be identified on the same plasmid, conferring selective advantage to the bacterial recipient when several antimicrobials are simultaneously administered. Plasmids conferring multi-drug resistance are usually large (>50 kb), self-conjugative and encode sophisticated mechanisms controlling their copy number, regulating the rate of replication (261,262).

In this study, we investigated the diversity of plasmids present in CRKP using short-read sequence data obtained from all isolates, in order to assess the prevalence of the carbapenemase-encoding plasmids in our area. It's important to mention that this approach cannot reveal whether there have been insertions or rearrangements relative to the reference plasmid, or whether a particular resistance gene is integrated into the same plasmid or located elsewhere, but nevertheless provides an indication of how much of each plasmid backbone is present. We determined the prevalence of the *bla*_{OXA}-carrying plasmid sequence across all *bla*_{OXA}-carrying isolates in the sample collection.

All the *bla*_{OXA-48}-positive isolates had short reads that mapped >>99% of the circularized 63.5 kb IncL/M (pOXA-48) plasmid. These findings demonstrate a strong association between the presence of *bla*_{OXA-48} and the pOXA-48 plasmid. Isolates carrying *bla*_{OXA-48} and possessing >>99% of the IncL/M (pOXA-48) plasmid sequence belonged to 9 different STs (11,15,17,36,101,147,252,307,437), but the most prevalent one was ST307. No other resistance

determinants were found in this plasmid types, suggesting that other plasmids or chromosomally-encoded resistance genes are also present.

An earlier study reported the significant role that IncL/M plasmids play in the dissemination of *bla*_{OXA-48} genes in *K. pneumoniae* strains worldwide. Our findings also proved that *bla*_{OXA-48} gene is usually located on conjugative IncL/M plasmids, strongly coinciding with those from the literature and demonstrate the widespread nature of this plasmid (263,264). There is a highly dynamic scenario in which pOXA-48 plasmid produces a wide distribution of fitness effects, ranging from costs to benefits. However, a study showed that in the case of specific STs (ST11 in this case), the fact of carrying a pOXA-48 plasmid produced non-significant or even beneficial fitness effects (265). These findings would coincide with ours, as many ST11 isolates in our study carried the pOXA-48 plasmid. However, further investigation should be done in order to explain the differences in fitness cost, dictating the epidemiology of plasmid-bacterium associations in clinical settings.

By contrast, we found *bla*_{NDM} genes on multiple diverse plasmids and less frequently than pOXA-48 plasmids, which is concordant with reports from the literature (264,266,267), as the transfer efficiency of POXA-48 has been found to be 40-fold higher than that of pNDM (268). Previous studies identified *bla*_{NDM-1} on IncF, IncL/M, IncN, A/C and IncX plasmids (269). Herein, *bla*_{NDM-1} producing *K. pneumoniae* were mostly associated with IncF, followed by IncL, which agree with reports from other countries such as Nepal, Taiwan, Oman, Myanmar, Canada and South Africa (270-273). In the case of *bla*_{NDM-23}, the new resistant determinant found in this study, it was located on an IncF plasmid-type. The study shows that plasmids harboring *bla*_{NDM} genes also contained other resistance genes such as *RmtF*, *sul*, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{CTX-M}, etc., as already described in the literature (274). The very close sequence and resistome similarity between this study's plasmids and those obtained from different and same species in other studies worldwide portrays the global dissemination of IncF, IncX, IncN and IncI plasmids and their role in ARGs dissemination among bacteria. Furthermore, it shows that not all plasmid types harbor rich resistomes, as IncX

for example was mainly limited to only three ARGs. The relatively lower diversity and abundance of ARGs on these plasmids than the resistomes observed in *K. pneumoniae* strains is because *K. pneumoniae* isolates contain multiple plasmids alongside chromosomes, which carry additional ARGs (256). Unfortunately, plasmid assemblies derived from short-read data are usually highly fragmented as a result of numerous repetitive elements (e.g., insertion sequences), and often cannot be distinguished from chromosomal sequences. Recently, these problems have been overcome by the advent of long-read sequencing, which now readily enables complete (or near-complete) and accurate resolution of plasmid sequences, particularly when the data are assembled together with short reads (275,276). In our study it was not possible to completely close the plasmid, due to this limitation of the technique.



5. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* nosocomial outbreaks

K. pneumoniae nosocomial infections are caused by diverse clones that are widely geographically distributed. However, a subset of these contribute disproportionately to global disease burden, which we refer to “global problem clones” (284). These include the well-studied clonal groups (CG): CG258 alongside CG15, CG20 (CG17), CG29, CG37, CG147, CG101 (CG43) and CG307, which are not related to one another but are each widely geographically distributed and common causes of MDR hospital-acquired infections and/or outbreaks (80,284,285). Public health interventions to control the current epidemic of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* rely on a comprehensive understanding of its emergence and spread over a wide range of geographical scales (161).

High-risk clones likely possess certain beneficial biological factors that lead to increased “fitness”, providing such strains with Darwinian survival skills, edging out other isolates of the same species (286). This provides them with abilities to outcompete other bacteria and become the main part of the bacterial population, initially as colonizers that will later lead to infections (287).

Here we used two different approaches to identify nosocomial outbreaks using molecular methods: one by using PFGE, which consists of digesting chromosomal DNA with restriction endonucleases (288). The DNA restriction patterns of the isolates are then compared with one another to determine relatedness (A limitation of this technique is that PFGE usually resolves a limited number of fragments (about 10-20), so only relatively major genetic events can result in changes in fingerprinting patterns. PFGE patterns will remain unchanged if the genetic events are relatively minor, such as point mutations, insertions or deletions of a relatively small DNA fragment not involved in the restriction site (288).

PFGE can be ambiguous, especially when analyzing a large number of strains. Nevertheless, it provided our study a simple overview of the population of *K. pneumoniae* in our settings. On the other hand, using NGS technology to obtain phylogenetic trees helps us get a real picture of what

happened over a four-year period at a large tertiary hospital. MLST typing also helped in the outbreak characterization, because obtaining different STs meant no epidemiological relationship.

In a multicenter study performed with *K. pneumoniae* strains from the European continent by David Sofia et al, carbapenemase-positive isolates are concentrated in the major clonal lineages of *K. pneumoniae sensu stricto*. In particular, the major epidemic clones identified belong to ST11, ST15, ST147 and ST258 (161). The major lineages are also characterized by low levels of core genome diversity, which indicates a recent and common evolutionary descent. In our study, only 150 strains underwent PFGE because they were a representative sample of those suspect of being related. Besides, all the 237 strains underwent NGS so we would have a more reliable phylogenetic tree.

PFGE was used basically for outbreak characterization together with MLST typing, whereas NGS techniques were applied to obtain the phylogenetic tree of all the studied strains. In our study, the most frequent STs identified have been ST307, ST11 and ST101, followed by ST437. These four STs were responsible for the outbreaks caused by seven different clones (by PFGE) throughout the four years of the study.

K. pneumoniae ST101 (clone A in our study) is an emerging clone that has been identified in different parts of the world with the potential to become a global, persistent public health threat (289). According to our findings, only one clone of this ST was found, persisting through the years until our last year of study (2018), and it is probably moving around. This clone has been responsible of one of the major outbreaks in our settings, acquiring and losing plasmids containing carbapenemase genes.

K. pneumoniae ST11 (clone B1 and B2 in our study), belonging to clonal complex 11 is considered a potential high-risk clone, whose strains face more severe forms of drug resistance and treatment challenges than other clonal complexes (290,291). Two clones belonging to ST11 were found by both PFGE and NGS, accounting for a total of 49 isolates from 2015 until 2018. The notorious event about this ST is the change of carbapenemase genes throughout the years: early in

2015, the main carbapenemase gene for this ST was *bla*_{DHA-1}, whereas from 2016 on, *bla*_{OXA-48} arrived to stay. This coincided with a higher antibiotic pressure and with the fact that *bla*_{OXA-48} is found in a small self-replicative plasmid that shows very efficient conjugation within bacterial species, helping to explain their predominance (292).

K. pneumoniae ST307 (clone C1 and C2 in our study) is also an emerging AMR high-risk clone that emerged during the mid-1990s and has been responsible for several worldwide nosocomial outbreaks (296). Certain characteristics of ST307 may lead to increased fitness, persistence and adaptation to the hospital environment, which would explain the isolation during the four years of this ST in our hospital settings. Several studies have shown that symptomatic and asymptomatic patients in hospital settings are colonized with ST307 *K. pneumoniae* (294-296). When comparing results from PFGE and NGS, we observed that the phylogenetic tree obtained showed also two clones.

K. pneumoniae ST437 belongs to the clonal complex 11 (like ST11). The most remarkable feature occurring in this ST is a new metallo- β -lactamase: *bla*_{NDM-23}, which has not been yet described elsewhere. Plasmid harboring this *bla*_{NDM-23} is not transferable as it lacks relaxases, which is probably the reason why it is only found in this ST (unpublished data). After obtaining the phylogenetic tree for this ST, we also found that instead of two related clones, there was only one clone as in the case mentioned before.

Our data highlight the dynamic nature of ST101, ST11, ST307 and ST437, with their isolates having caused repeated ward-associated outbreaks over four years, and accounting for more than 85% of all the isolates in the study.

To qualify as an international multidrug-resistant high-risk clone, clones must possess the following characteristics: (i) a global distribution, (ii) an association with various antimicrobial resistance determinants, (iii) the ability to colonize and persist in hosts for long time intervals (>6 months), (iv) the ability for effective transmission among hosts, (v) enhanced pathogenicity and fitness, and (vi) the ability to cause severe and/or recurrent infections (297).

In our study, most of the strains were isolated from surveillance samples or from catheters, highlighting the ability of these clones to survive and colonize patients, which coincides with data from the literature as previously mentioned.

The genomic epidemiology of CRKP at our institution over a four-year period illustrates the emergence and dominance of CRKP clones, which have evolved over time in different ways. Some clones caused outbreaks that were subsequently eliminated, while others have persisted. These data highlight the evolution of endemic subpopulations among hospitalized patients and the continued challenge of preventing serious CRKP infections in the health-care settings.

6. Integration of Next-Generation Sequencing into Clinical Microbiology

DNA sequencing technologies have existed since the early 1970's, but initially their cost, complexity, and requirement for special reagents limited their use to research settings (298). A major change occurred in the early 2000's, when new next-generation sequencing methods using massively parallel processing brought the cost down and reduced sequencing time. During the 2010's, whole-genome sequencing for bacterial pathogens began migrating from research laboratories into public health practice (299), in order to study important outbreaks. Within a few years, whole-genome sequencing began to be used more widely to elucidate and interrupt transmission pathways in hospital outbreaks, such as those caused by *K. pneumoniae* (300). Whole-genome sequencing has the potential for rapidly providing a large amount of information from isolates, including species, strain type, antibiotic resistance (including discovery of novel resistance mechanisms like in our study), plasmids, virulence and other information for outbreak and case management. However, this technique cannot accurately predict susceptibility. In fact, in our results, concordance between genotype and phenotype was not good, because resistance gene detection did not necessary imply antibiotic resistance. This finding suggests that antibiotic susceptibility profiles should always be confirmed by phenotypic antibiotic susceptibility testing (301).

In this study we performed an in-depth molecular characterization of 205 CRKP. Using a whole-genome-based approach, we analyzed the genetic relatedness, antimicrobial resistance, and the virulome of the isolates under study. We showed that *K. pneumoniae* strains circulation in our area are carriers of multiple resistance and virulence determinants through clonal and plasmid-mediated dissemination (256), which completely coincides with conclusions from other studies. We also identified and characterized plasmids, virulence genes and new resistant genes in *K. pneumoniae* strains, which wouldn't have been possible with the currently implemented techniques in a clinical Microbiology laboratory.

A striking but worrying feature of the isolates included in this study is their multi-drug resistant phenotype, including in some cases resistance to last-resort antibiotics (besides carbapenems), such as colistin and tigecycline, and their widespread distribution in some hospital wards throughout the years, and thus it is of paramount importance to have all the possible information about them.

Until now, the impact of NGS has so far been limited, but it is starting to revolution epidemiological analysis of cultures for infection control and outbreak detection (301). In our case, NGS technology has been a very useful tool in the understanding of the mechanisms of antimicrobial resistance, virulence and specially the clonal spread of *K. pneumoniae* isolates. In other studies, NGS is mainly used to map outbreaks of other microorganisms such as *Legionella* (302), salmonellosis (303) and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (304).

To sum up, we need to resolve the current technical barriers to the introduction of NGS, but we also need to produce a new generation of scientists and clinicians who can interpret the very complex datasets generated by the new hardware and software solutions and deliver them to patients who will be concerned about the implications. It is a great moment for the introduction of NGS in clinical microbiology laboratories. If NGS data can be used to identify both the bacterial cause of an infection and the genes responsible for resistance, then antibiotic stewardship can also be improved and would represent a major step forward in clinical practice (305). Over the next 5 to 10 years, although it is unlikely to see NGS completely supplant traditional identification and antimicrobial susceptibility testing methods, a wealth of applications must be acquired, providing this way enhanced diagnostic capabilities for patients (301).

Limitations of the study

- Information regarding patient's hospital stay was sometimes limited, especially regarding treatment and stay at the intensive care unit of our hospital, as they use a different program.
- As active surveillance for resistant microorganisms is performed only for patients at the intensive care unit, information about previous colonization of the patients was only available for those specific patients.
- As this was a retrospective study, recovery of the samples was not successful for all of the strains initially included in the study, as some of them were contaminated and could not be processed.
- Next-generation sequencing technologies typically generate shorter sequences, making it difficult to completely close a circular plasmid.

VI. Conclusions

1. In this study, we have combined both traditional and last generation techniques in order to better study the CRKP strains that have appeared in four years in our hospital settings. Molecular techniques allowed us to explore in-depth the resistome, the mobilome, the genetic variation within the *K. pneumoniae* population and the genetic relatedness of the isolates.

2. More than half of the patients infected and/or colonized by CRKP were over 70 years old. CRKP isolates were more likely to be nosocomial than community-acquired. Previous hospital stay, previous surgery or surgery complication, previous antimicrobial therapy, carrying a urinary catheter, suffering from DM and having a chronic renal or pulmonary disease were found to be statistically significant risk factors for suffering a CRKP infection and/or colonization.

3. Resistance rates to β -lactam antibiotics were high. All the isolates showed non-susceptibility to ertapenem, but variable susceptibility to imipenem and meropenem. Co-resistance to non- β -lactam antimicrobial agents was found in most of the isolates in the study: more than 90% were found to be resistant to fluorquinolones; around 70% to gentamycin and tobramycin, and 75% to trimethoprim-sulfamethoxazole. Colistin, tigecyclin and fosfomycin were the antimicrobial agents with the highest susceptibility rates.

4. *bla*_{AmpH} genes were present in all the isolates, followed by *bla*_{SHV} genes (97%), *bla*_{OXA-1} genes (81%), *bla*_{CTX-M} genes (60%) and *bla*_{TEM} genes (46%). The most prevalent carbapenemase genes detected by both PCR and NGS was *bla*_{OXA-48} (50%), followed by *bla*_{NDM-1} (16%).

5. The multi-replicon nature of the detected plasmids, the observed diversity of STs and K-types, and the coexistence of specific virulence factors with a very high number of ARGs may suggest the possible emergence of a population of untreatable *K. pneumoniae*. The OmpK36 porin genes of 93% of the isolates were mutated, suggesting the possible synergistic role in the multidrug resistance phenotype of these strains.

6. The phylogenetic analyses indicated that carbapenemase-carrying plasmids were non-randomly associated with high-risk clones ST101, ST11, ST307 and ST437, propagating by clonal expansion and frequently spreading across health-care networks.

7. Simultaneous outbreaks occurring throughout the years of the study (2015-2018) showed the importance of characterizing these isolates to try and stop their spread. To our knowledge, this is the first comprehensive whole-genome based characterization of CRKP in our area, and the first detection and description of *K. pneumoniae* co-producing *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1} and *bla*_{CTX-M-15}. Furthermore, *bla*_{NDM-23} is a new metallo- β -lactamase detected for the first time in three strains of our study.

8. Even though Next-Generation Sequencing cannot completely supplant traditional identification and antimicrobial susceptibility testing methods, it is a technique that is revolutionizing the future of Clinical Microbiology.

VII. Anexos

Tabla 8.1. Anexo recogida de datos

Historía clínica		
Sala hospitalización		
Hospitalización previa	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
Tipo de infección	Comunitaria	IRAS
Antibióterapia reciente (<30 días)	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
Comorbilidades	DM	Cirrosis
	Insuficiencia renal crónica	Enfermedad pulmonar crónica
	Uropatología funcional	Uropatología estructural
	Colonización previa	Catéter urinario
Incidencias durante la hospitalización	Sepsis	Cirugía o complicaciones derivadas de la misma
	Neumonía asociada a ventilación mecánica	Neumonía no asociada a ventilación mecánica

VIII. Producción científica

Eazyplex[®] SuperBug CRE system for the rapid detection of carbapenemase and extended spectrum beta-lactamase genes in gram-negative bacteria

Begona F Escrivá^{1*}, Carme S García¹, Nuria T Palop¹ and Concepción G Cardona^{1,2}

¹Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Spain

²Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Spain

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the performance of the Eazyplex[®] SuperBug CRE system, which consists of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based system for the detection of resistance genes in gram-negative rods. A total of 215 isolates were included in the study after showing resistance to third generation cephalosporins and/or carbapenems. One sample per patient was selected. In 10 cases, the test was performed directly from the positive blood culture. Phenotypic methods for the detection of extended spectrum β -lactamases and carbapenemases were performed. Results were analysed to establish the efficiency of the Eazyplex[®] SuperBug CRE system. The system correctly detected *bla*_{CTX-M} genes and *bla* carbapenemase genes in all the studied strains. Total concordance was observed between the results obtained using the Eazyplex[®] Superbug CRE system and phenotypic results compatible with the presence of a carbapenemase and/or ESBL.

The eazyplex[®] SuperBug CRE system has proved to be an easy-to-use tool for the detection of carbapenemases, as well as CTX-M-type ESBLs in only 15 minutes. The system provides information that can improve the antimicrobial therapy results, and it can be useful as an epidemiologic tool in fighting against the spread of multidrug resistant bacteria.

Introduction

Bacterial resistance to antibiotics has become an important threat and it is a major source of concern for public health [1]. Gram-negative rods (especially *Enterobacteriaceae*) have the ability to easily spread among humans and are also able to acquire resistance genes through horizontal gene transfer, mediated mostly by plasmid and transposons [2].

Rapid diagnostic tools that allow resistance genes detection such as the Eazyplex[®] SuperBug CRE system can help to control the spread of extended spectrum β -lactamase (ESBL) and carbapenemase producers, as well as to better and earlier adjust antimicrobial treatment [3,4], especially when it comes to complicated infections.

The aim of this study was to evaluate the Eazyplex[®] SuperBug CRE system as a rapid molecular technique for the detection of ESBL and carbapenemase genes among Gram-negative bacteria isolated at the Microbiology Department of Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (Spain) during a one-year period.

Materials and methods

The study took place from 1st December 2016 until 30rd November 2017 at the Microbiology Service of Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (Spain). A total of 215 microorganisms were included in the study (Table 1) after having been examined according to the laboratory routine testing, using broth microdilution and interpreting the results according to Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) [5]. Gram-negative rods isolated from clinical samples and active surveillance which were resistant to third generation cephalosporins and/or carbapenems were chosen. The suspicion

of ESBL and/or carbapenemase production was inferred from the β -lactams minimal inhibitory concentration (MIC) profiles obtained with the MicroScan system (SIEMENS, West Sacramento, CA, USA) [6]. These 215 isolates were then submitted to the test and at the same time, phenotypic methods for detection of resistance were performed. Only one sample per patient was selected. In ten of the 215 patients included in the study, the test was performed directly from positive blood cultures. They were all at the Intensive Care Unit (ICU) and were already colonized by carbapenemase-producing gram-negative bacteria.

The Eazyplex[®] SuperBug CRE system (Amplex Biosystems GmbH, Giessen, Germany) [7] is a qualitative genotypic diagnostic test consisting of a freeze-dried, ready-to-use mixture for an isothermal amplification reaction that covers carbapenemase variants of the VIM (-1 to -37), NDM (-1 to -7) and KPC (-2 to -15) families, part of the OXA-48 family (-48, -162, -204 and -244), OXA-181 and the CTX-M ESBL families (CTX-M-1 group and CTX-M-9 group) from gram-negative bacteria. Amplification products that are generated by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) are visualized by real-time fluorescence measurement of a fluorescent dye bound to double-stranded DNA using the GENIE II (OptiGene, Horsham, UK) instrument.

*Correspondence to: Begoña Fuster Escrivá, Paseo Luis Vives, 11 46780 Oliva, Valencia, Spain, E-mail: begona.fuster@gmail.com

Received: September 05, 2019; Accepted: September 16, 2019; Published: September 19, 2019

Colonies of the isolates were inoculated with a loop in RALF buffer (provided with the kit) and incubated for 2' at 99°C, then pipetted in the lyophilized test tubes for amplification reaction in the Eazyplex® Superbug CRE system. Detection of carbapenemase and ESBL genes takes only 15 minutes and it is performed for Gram-negative single bacterial colonies or even directly from positive blood culture bottles.

Special features for positive blood cultures: After performing gram-staining to make sure they had a bloodstream infection caused by gram-negative rods, 25 µL of the blood were pipetted into the tubes provided in the kit, then heated at 99°C for 2 minutes, and then centrifuged at low speed (4000 rpm) for 1 minute. 25 µL of the lysate is pipetted into each tube of the Eazyplex strip and the test can run as from bacterial colonies.

Phenotypic detection of extended spectrum β-lactamases was performed by the double-disc synergy test and with the ESBL Confirm Kit (ROSCO Diagnostica, Taastrup Denmark). Phenotypic methods for carbapenemase production detection included: β-Carba test (BIORAD), the inhibition profile using ROSCO KITS™ (KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit), Imipenem/Imipenem + EDTA MIC Test Strips for in vitro detection of Metallo β-lactamases (Liofilchem) and immunocromatography for the detection of OXA-48 production (Letitest). The strains *Escherichia coli* ATCC 25922 (wild type) and *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 (KPC-2 producer) were used as negative and positive controls, respectively.

Results obtained using the eazyplex® Superbug CRE system were compared to those obtained with phenotypic methods, and later classified as concordant or discordant.

Results

The most frequently detected extended spectrum β-lactamase was CTX-M-1, which appeared in 167 cases (alone or together with a carbapenemase), whereas CTX-M-9 was only found in 7 cases (5 of them together with a carbapenemase).

The most frequently detected carbapenemase in this period of time was OXA-48 (153), followed by NDM Metallo-β-lactamase (33), both mostly found in *Klebsiella pneumoniae*. KPC production was only found in one *Enterobacter cloacae* isolate and in one *Klebsiella pneumoniae* isolate. Regarding non-*Enterobacteriaceae*, among the 20 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* that were included in the study, all of them harboured VIM Metallo-β-lactamase, and in one case there was co-production of ESBL+ Metallo-β-lactamase.

Among the 153 isolates that harboured *bla*_{OXA-48}, 137 of them were *bla*_{CTXM} producers (CTXM-1 group and CTXM-9 group). *bla*_{OXA-48} and *bla*_{NDM} co-production was detected in 14 cases, all of them co-producing ESBL as well.

Concordance of 100% was observed between the results obtained using the Eazyplex® Superbug CRE system and the phenotypic methods, including those obtained directly from positive blood cultures: all of them were positive for *bla*_{OXA-48} and *bla*_{CTXM-1}, identified as *Klebsiella pneumoniae* and were later concordant with the MIC profiles and phenotypic methods. The double-disc synergy test was sensitive enough to confirm the presence of an ESBL when co-expressed with a carbapenemase. Furthermore, the ROSCO KITS™ was able to detect co-production of carbapenemases.

In table 1 gram-negative bacteria included in the study are described and classified according to the ESBL and/or carbapenemase-encoding gene and it also the results inferred from the phenotypical methods.

Table 1. Resistance genes detected in 215 Gram-negative bacteria isolates

Microorganism (total no of isolates)	Genes detected by the Eazyplex® Superbug CRE system	Phenotypically detected resistance mechanism
<i>Enterobacter cloacae</i> (3)	<i>bla</i> _{KPC} (1)	ESBL
	<i>bla</i> _{OXA-48} (2)	OXA-48
<i>Escherichia coli</i> (6)	<i>bla</i> _{CTXM-1} (2)	ESBL
	<i>bla</i> _{CTXM-9} (1)	ESBL
	<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{CTXM-1} (2)	OXA-48+ESBL
	<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{CTXM-9} (1)	OXA-48+ESBL
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (182)	<i>bla</i> _{CTXM-1} (15)	ESBL
	<i>bla</i> _{CTXM-9} (3)	ESBL
	<i>bla</i> _{OXA-48} (14)	OXA-48
	<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{CTXM-1} (113)	OXA-48+ESBL
	<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{CTXM-9} (4)	OXA-48+ESBL
	<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{NDM} + <i>bla</i> _{CTXM-1} (14)	OXA-48+ Metallo-β-lactamase +ESBL
	<i>bla</i> _{NDM} (3)	Metallo-β-lactamase
	<i>bla</i> _{NDM} + <i>bla</i> _{CTXM-1} (15)	Metallo-β-lactamase +ESBL
	<i>bla</i> _{KPC} + <i>bla</i> _{CTXM-1} (1)	Class A carbapenemase+ESBL
	<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{NDM} + <i>bla</i> _{CTXM-1} (1)	OXA-48+ Metallo-β-lactamase +ESBL
<i>Klebsiella oxytoca</i> (2)	<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{CTXM-1} (1)	OXA-48 +ESBL
	<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{CTXM-1} (1)	OXA-48 +ESBL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (20)	<i>bla</i> _{VIM} (19)	Metallo-β-lactamase
	<i>bla</i> _{VIM} + <i>bla</i> _{CTXM-1} (1)	Metallo-β-lactamase + ESBL
<i>Proteus mirabilis</i> (1)	<i>bla</i> _{CTXM-1} (1)	ESBL
<i>Serratia marcescens</i> (1)	<i>bla</i> _{OXA-48} + <i>bla</i> _{CTXM-1} (1)	OXA-48+ ESBL

Discussion

After analysing the phenotypic detection of both carbapenemase and ESBL production, kappa coefficient (κ) of 1 was observed when comparing the results with the Eazyplex® SuperBug CRE system results, as shown in table 1. It is important to mention the correct detection of both ESBL and carbapenemase co-production, as well as carbapenemase co-production, which can sometimes be challenging to identify when only using phenotypic methods.

Preliminary results from positive blood cultures are promising (no previous studies about this specific subject have been performed), but further studies are assured, as only ten samples with these characteristics were studied.

Results with non-*Enterobacteriaceae* microorganisms were also evaluated favourably, as testing with *Pseudomonas aeruginosa* was successful in all cases. One anaerobe, *Bacteroides fragilis*, was also tested yielding a concordant ESBL-positive result.

One limitation of the test would be that it only covers the most spread resistance genes for ESBL and carbapenemase and would not work in case an isolate carried an infrequent resistance gene. However, it succeeded to cover the genes in all our isolates.

To summarize, patients infected by multidrug resistant Gram-negative bacteria have higher mortality rates and thus require an effective and quickly adjusted treatment. The use of rapid methods for the detection of resistant microorganisms is really important (especially if it can be done directly from positive blood cultures), as it provides information that can improve antibiotic therapy results as well as the patient's outcome. On the other hand, the Eazyplex® Superbug CRE system could also be used as a tool for epidemiology issues for each Healthcare centre, and thus implement the proper hygiene measures in order to avoid the spread of these threatening multidrug resistant bacteria.

Acknowledgements

The authors want to thank the team at the Microbiology Department of Valencia's General Hospital.

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

References

1. Nordmann P (2014) Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect* 44: 51-56. [[Crossref](#)]
2. Nordmann P, Naas T, Poirel L (2011) Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 17: 1791-1798. [[Crossref](#)]
3. Nordmann P, Poirel L (2014) The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* 20: 821-830. [[Crossref](#)]
4. García-Fernández S, Morosini M-L, Marco F, Gijón D, Vergara A, et al. (2015) Evaluation of the eazyplex® SuperBug CRE system for rapid detection of carbapenemases and ESBLs in clinical Enterobacteriaceae isolates recovered at two Spanish hospitals. *J Antimicrob Chemother* 70: 1047-1050. [[Crossref](#)]
5. Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines. Available at: <https://clsi.org/>
6. McGregor A, Schio F, Beaton S, Boulton V, Perman M, et al. (1995) The MicroScan WalkAway diagnostic microbiology system--an evaluation. *Pathology* 27: 172-176. [[Crossref](#)]
7. Amplex - Because we care. Available from: <https://www.eazyplex.com/>

Detection of two simultaneous outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* coproducing OXA-48 and NDM-1 carbapenemases in a tertiary-care hospital in Valencia, Spain

B. Fuster¹, N. Tormo¹, C. Salvador¹ and C. Gimeno^{1,2}

1) Consorcio Hospital General Universitario de Valencia and 2) Department of Microbiology, School of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

Abstract

Klebsiella pneumoniae is one of the most common hospital-acquired Gram-negative pathogens. During the last decade, the emergence of strains with reduced susceptibility or resistance to carbapenems is becoming a therapeutic challenge. This study takes place after the isolation of 14 strains of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* with similar susceptibility patterns and carriage of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases genes. Fourteen patients were found to be colonized (faecal carriage) and/or infected by two different clones of carbapenemase-coproducing *K. pneumoniae* during a 1-year period of time. Some of the patients had shared a hospital ward and continued to be colonized several months after the outbreak.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd.

Keywords: Antibiotics, carbapenemase, *Klebsiella pneumoniae*, nosocomial, resistance

Original Submission: 23 October 2019; **Revised Submission:** 24 January 2020; **Accepted:** 10 February 2020

Article published online: 16 February 2020

Corresponding author: B. Fuster, Consorcio Hospital General Universitario, Avenida Tres Cruces 2, Valencia, Spain.
E-mail: begona.fuster@gmail.com

The first three authors contributed equally to this article, and all should be considered first author.

Introduction

Carbapenemase production among *Enterobacteriaceae* is becoming a major problem worldwide. One of the species closely related to the spread of such enzymes is *Klebsiella pneumoniae*, an important pathogen involved in serious nosocomial infections [1] and whose expansion by means of high-risk clones harbouring plasmid resistance genes has been widely reported [2–5]. OXA-48, NDM-1 and KPC are the most frequent carbapenemases detected nowadays in *K. pneumoniae* [6]. Their increase favours the emergence of carbapenemase-coproducing isolates. In the present study, we report the outbreak detection of two different clones of *K. pneumoniae* coproducing NDM-1, OXA-48 and CTX-M-

15 enzymes in the same institution in a short period of time.

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia is a healthcare facility complex with a reference population of almost 360 000 inhabitants in Valencia, Spain. The first cases of carbapenemase production in *Enterobacteriaceae*—mainly *K. pneumoniae* carrying OXA-48—were detected in 2014. At that time no carbapenemase production had been reported in our area, although we had implemented surveillance for carbapenemase production in carbapenem-resistant isolates according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines [7]. Since then the number of such isolates has raised dramatically in our healthcare setting, especially in 2016 (unpublished data). An imported case of NDM-1 carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in November 2015 marked the emergence of these metallo- β -lactamases in our hospital. In October 2016, coproducing OXA-48, NDM-1 and CTX-M-15 *K. pneumoniae* was initially isolated in the urine sample from a patient who arrived in the emergency ward from home but who had been discharged from the hospital 10 days before. During the following 10 months, another 13 patients were found to be faecal carriers and/or infected by this carbapenemase-coproducing microorganism.

New Microbe and New Infect 2020; 34: 100660

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

<https://doi.org/10.1016/j.nmi.2020.100660>

Since then, no more patients have been found to carry this multidrug-resistant carbapenemase-coproducing *K. pneumoniae*. Further, interestingly, NDM-1 carbapenemase is at present detected in a very low rate compared to OXA-48 enzyme, which is by far the predominant carbapenemase identified in *Enterobacteriaceae* in our setting (unpublished data).

The objective of this study was to retrospectively analyse whether the strains coproducing both carbapenemases were clonal and carried related plasmids or not; and to establish a possible epidemiologic relationship between the patients infected and/or colonized by these microorganisms.

Materials and methods

Bacterial identification and broth microdilution susceptibility testing were performed using the commercial platform MicroScan Walkaway Plus system (Beckman Coulter, Brea, CA, USA); when necessary, MIC confirmation was performed by gradient test (Liofilchem, Waltham, MA, USA). The MICs of ampicillin, amoxicillin clavulanate, piperacillin/tazobactam, cefuroxime, cefoxitin, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, ertapenem, imipenem, meropenem, norfloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, gentamicin, tobramycin, amikacin, fosfomicin, tigecycline, colistin and trimethoprim/sulfamethoxazole were determined. Some of the antibiotics being tested varied depending on the origin of the sample, such as norfloxacin and fosfomicin in urine samples. Susceptibility breakpoints were interpreted according to the recommendations of the CLSI [7], except for colistin and tigecycline, also tested using MicroScan Walkaway Plus system [8], but interpreted according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoints [9].

Carbapenemase production and phenotypic characterization were assessed when nonsusceptibility to ertapenem, meropenem or imipenem was detected following CLSI breakpoints [7]. Firstly, screening of carbapenemase with the β -CARBA test (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was performed, followed by the 'KPC, MBL and OXA-48 confirmation kit: carbapenemases' (Rosco Diagnostica, Taastrup, Denmark) in case of positive results for the β -CARBA test. Carbapenemase genes were detected by the Xpert-carba-R (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), BDMax CRE (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) or either Eazyplex SuperBug CRE (Amplex Biosystems, Giessen, Germany) and sequenced by in-house Sanger PCR. The primers used in order to obtain PCR products for Sanger sequencing are summarized in Table 1.

Clonal diversity of isolates was performed by both pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST). PFGE was performed according to the

TABLE 1. Specific primers used for detection and sequencing of OXA-48, NDM-1 and CTX-M β -lactamases

Gene	Name	Sequence	Reference
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48F	TTGGTGGCATCGATTATCGG	[10]
	OXA-48R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	
<i>bla</i> _{NDM-1}	NDM-1F	CCAAATATTATGCCACCCGGTGC	[11]
	NDM-1R	ATCGGGCCCGTATGAGTGATTG	
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	CTX-M-1-SEQ-F	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC	[11]
	CTX-M-1-SEQ-R	CAGCGCTTTTCCCGCTAAAG	

F, forward; R, reverse.

procedure described by Gautom [12]. Restriction patterns were analysed and interpreted visually by two people according to the criteria of Tenover et al. [13]. Sequence types were determined on the basis of the genetic variation of *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* and *tonB* housekeeping genes, as described online (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>).

Conjugation experiments with azide-resistant *Escherichia coli* J53 used as recipient and selection on Müller-Hinton plates containing sodium azide (100 μ g/mL) and imipenem (4 μ g/mL) were performed in order to characterize the plasmid or plasmids carrying *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM-1} and/or *bla*_{CTX-M-15}. Transconjugants were later investigated for extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and carbapenemase production by PCR using the Eazyplex SuperBug CRE kit (Amplex Biosystems, Giessen, Germany). Plasmid typing was performed with the PBRT kit (Diateva, Fano, Italy) in every transconjugant [14].

Results

We found that all the strains harboured OXA-48 and NDM-1 carbapenemases, as well as a CTX-M-15 ESBL, by means of commercial kits followed by sequencing confirmation of the abovementioned *bla* genes. We obtained two different clones according to results of both PFGE and MLST, which correlated perfectly. Twelve isolates belonged to PFGE pattern A and sequence type (ST) 101 and two strains to PFGE pattern B and ST437. Fig. 1 shows a PFGE gel image of four strains belonging to pattern A.

In the conjugation experiment, different transconjugants were detected: one harbouring OXA-48 only, another harbouring NDM-1 and CTX-M-15, and another harbouring OXA-48 and CTX-M-15. Regarding plasmid typing, OXA-48 was found in an IncLM plasmid without other resistance determinants, and NDM-1 was found in an IncFIB plasmid with other resistance determinants such as CTX-M-15 β -lactamase. Both OXA-48 and NDM-1 carbapenemases were never found together in the same plasmid after conjugation experiments.

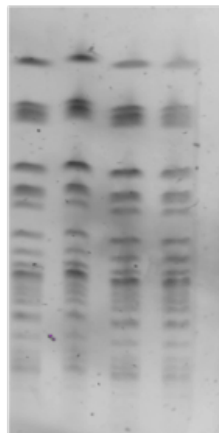


FIG. 1. Pulsed-field gel electrophoresis image showing results of four strains belonging to pattern A.

Susceptibility was assessed phenotypically: all the strains showed resistance to all β -lactams, including meropenem, imipenem and ertapenem; additionally, they were resistant to ciprofloxacin, gentamicin and tobramycin, but they had different susceptibility patterns to trimethoprim/sulfamethoxazole, fosfomicin, amikacin, tigecycline and colistin. After the detection of the two different clones, the following differences in the susceptibility patterns between both clones were realized: pattern A isolates were always susceptible to trimethoprim/sulfamethoxazole and resistant to amikacin, whereas pattern B isolates were resistant to trimethoprim/sulfamethoxazole and susceptible to amikacin. Table 2 provides a summary of the antimicrobial susceptibility pattern of each clone, its sequence type, its plasmid incompatibility group and the resistance genes detected.

Epidemiologic information showed a possible relationship among ten patients with pattern A strains due to ward sharing

(ward 1) in a short period of time (at the same time or within a 2-month difference). It was not possible to find relationship between two of the 12 patients of pattern A, even though the isolates belonged to the same ST and were clonal to the others. The two isolates of pattern B were found in two patients who were hospitalized in another ward (ward 2) than those of pattern A. The first case of pattern B occurred in a patient who had been previously discharged from another hospital in the same city. Time and space sharing between the different patients involved in the outbreaks is shown in Fig. 2.

Information about clinical, demographic and microbiologic features of the patients and microorganisms is shown in Table 3. It should be noted that during the study period, some patients were discharged from the hospital, then readmitted. It was in the second (or following) hospitalization episode when the coproducing isolate was detected, which complicates the discovery and follow-up of the outbreaks. After recompilation of epidemiologic data, no other relationship but sharing a room during the same period of time could explain the transmission of the two clones among the patients involved in the two outbreaks. Because we could not find any obvious epidemiologic relationship in patients 11 and 14 and they accounted for various admissions before the coproducing *K. pneumoniae* was isolated from one of their samples, we are not sure of the time these patients had been previously colonized (Table 3).

Discussion

Dissemination of *K. pneumoniae* isolates harbouring carbapenem resistance genes continues to increase. NDM-1 or OXA-48 harbouring *K. pneumoniae* isolates has been identified worldwide [4–6]. However, finding the coproduction of both carbapenemases in the same isolate has not been frequently reported in outbreaks of two or more patients. The first *K. pneumoniae* strain coproducing NDM-1 and OXA-48 was isolated from the urine sample of an elderly man in Morocco

TABLE 2. Clones, susceptibility profiles and resistance genes detected

Strain pattern	ST	Plasmid incompatibility group	Susceptibility profile	Resistance genes detected
A	ST101	IncL/M, IncFIB	S: SXT/TMP, ^a TIG, FOS, COL R: AK, ^a AMX/CLV, CPE, PIP/TZB, CTX, CAZ, CFX, ERT, MER, IMI, LEV, CIP, GEN, TOB.	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}
B	ST437	IncL/M, IncFIB	S: TIG, FOS, COL, AK, ^a SXT/TMP, ^a AMX/CLV, CPE, PIP/TZB, CTX, CAZ, CFX, ERT, MER, IMI, LEV, CIP, GEN, TOB.	<i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}

AK, amikacin; AMX/CLV, amoxicillin/clavulanate; CIP, ciprofloxacin; COL, colistin; CPE, ceftazidime; CTX, cefotaxime; ERT, ertapenem; GEN, gentamicin; IMI, imipenem; LEV, levofloxacin; MER, meropenem; PIP/TZB, piperacillin/tazobactam; R, resistant; S, susceptible; ST, sequence type; SXT/TMP, trimethoprim/sulfamethoxazole; TIG, tigecycline; TOB, tobramycin.
^aAntibiotics with susceptibility that changed depending on ST and pattern.

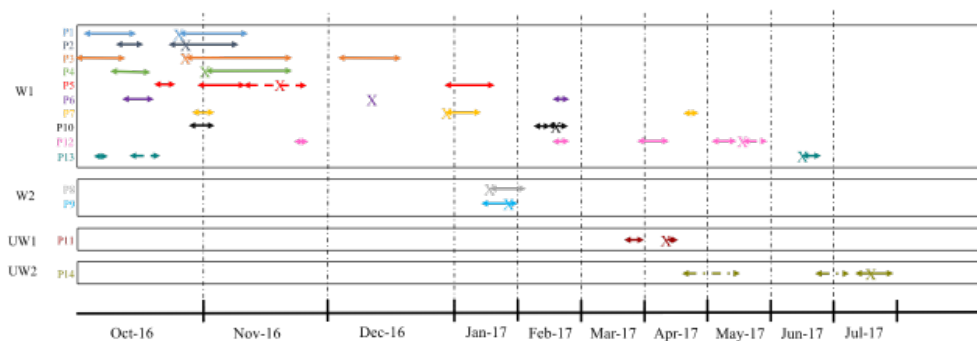


FIG. 2. Epidemiologic relationship of patients involved in two outbreaks. Solid arrows indicate periods of hospital stay for each patient; broken arrows, hospital stay in different ward; and X, moment when first isolate was obtained from each patient. P, patient, UW, unrelated ward, W, ward.

TABLE 3. Clinical, demographic and microbiologic features of 14 patients infected and/or colonized with *Klebsiella pneumoniae*

Patient No.	Date of first hospital admission	Date of first isolate	Time elapsed from first admission to carbapenemase detection (days)	Sample source	Hospital ward	ST (pattern)
1 ^a	03.10.2016	25.10.2016	22	Urine	W1	101 (A)
2 ^a	11.10.2016	26.10.2016	15	Blood, urine, faecal carriage	W1	101 (A)
3 ^a	01.10.2016	26.10.2016	25	Blood, urine, faecal carriage	W1	101 (A)
4 ^a	09.10.2016	26.10.2016	15	Urine, faecal carriage	W1	101 (A)
5 ^a	20.10.2016	19.11.2016	30	Blood, urine, faecal carriage	W1	101 (A)
6 ^a	12.10.2016	11.12.2016	60	Urine	W1	101 (A)
7 ^a	30.10.2016	30.12.2016	61	Urine	W1	101 (A)
8	17.01.2017	17.01.2017	0	Urine	W2	437 (B)
9	16.01.2017	27.01.2017	10	Urine, faecal carriage	W2	437 (B)
10 ^a	28.10.2016	17.02.2017	112	Urine	W1	101 (A)
11 ^a	25.03.2017	13.04.2017	19	Urine, faecal carriage, blood	UW	101 (A)
12 ^a	23.11.2016 or 21.02.2017 or 27.03.2017	21.05.2017	179 or 89 or 55	Urine, faecal carriage	W1	101 (A)
13 ^a	05.10.2016	19.06.2017	257	Urine	W1	101 (A)
14 ^a	22.04.2017 or 23.06.2017 or 13.07.2017	19.07.2017	88 or 26 or 6	Ulcer, faecal carriage	UW	101 (A)

UW, unrelated ward; W1, ward 1; W2, ward 2.

^aThese patients were discharged and then readmitted during study period.

in 2012 [15]. The second was reported in Tunisia, a country where OXA-48 producers are already endemic, as in Turkey [16]. The third was detected in the screening rectal swab of a patient transferred from the intensive care unit of a hospital located in Belgrade, Serbia, to Bern University Hospital in Switzerland, belonging to ST101, as did some of the strains in our study [17]. The present study reveals two outbreaks of carbapenemase-coproducing *K. pneumoniae* isolates in a tertiary-care hospital at the same time. In our case, the sequence types detected were 101 and 437, which have already been found to harbour NDM-1 and OXA-48 carbapenemases in Switzerland and Slovenia, where they also caused nosocomial outbreaks [17,18]. ST101 has already been identified in Spain as a carbapenemase carrier, and it is one of the sequence types widely distributed across Europe, having been submitted from 15 countries [19]. It is considered to be a high-risk clone that is often associated with outbreaks

[20,21]. It probably possesses particular characteristics that increase its tenacity, transmissibility and population size, thereby providing a greater opportunity for the acquisition of antibiotic resistance genes [4]. Regarding ST437, it has already been found to be involved in the interhospital spread of carbapenemase genes in Spain [22], although not coproducing carbapenemases.

In the last few years, *K. pneumoniae* has developed resistance to several antibiotic classes, leading to an increase in the life-threatening infections and to a major interest in the most appropriate treatments [5,23]. The strains in our study were considered to be multidrug resistant because they were found to be resistant to at least one agent in more than three antimicrobial families [24]. All the strains remained susceptible to colistin, fosfomicin and tigecycline, considered to be last-resort antimicrobial agents used to fight multidrug-resistant *K. pneumoniae* infections [25].

Regarding plasmid typing, all three types detected in our study have already been reported in the literature as carbapenemase carriers [26]. This shows the high risk of intra- and interspecies horizontal transmission of carbapenemase genes among successful genetic platforms, enhancing dissemination and persistence [27]. IncFIB has been found to carry NDM-I and CTX-M-15 ESBL in *K. pneumoniae* [27,28]. Although some other widespread carbapenemase determinants, such as the *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes, have been shown to disseminate through different plasmid scaffolds [29], the current spread of the *bla*_{OXA-48} gene is linked to the wide diffusion of an identical IncL/M plasmid scaffold. Previous studies indicated that plasmids carrying the *bla*_{OXA-48} gene from different enterobacterial isolates, different clones and different countries may share very similar features [30].

Regarding epidemiologic relatedness, it is important to mention the fact that some of the patients who were discharged and then readmitted after many months (more than 8 months in patient 13) were still either colonized, or both colonized and infected. It takes a long time for the patient to be uncolonized or for the bacteria to lose the carbapenemase-carrying plasmids, as previously described [31].

The first isolate of pattern B was found in a patient who had been previously discharged from another hospital in the same city, which would explain the coexistence of the two different clones in the same period of time and the lower number of pattern B isolates compared to pattern A. This is consistent with the idea that the co-carriage of different carbapenemases in a same clone is a frequent phenomenon, favoured by the coexistence in similar quantity of strains that carry one enzyme or the other.

It is also remarkable that during the outbreaks there were patients who were infected or colonized by different isolates of *K. pneumoniae*, some coproducing both carbapenemases and others carrying only OXA-48. This is of great interest because we found isolates carrying OXA-48 on its own, but there were no isolates carrying NDM-I without OXA-48. This may be because the plasmid carrying OXA-48 confers more stability to the bacteria, as it is a small and self-transferable plasmid that does not carry any additional resistance gene [32]. This would also explain the disappearance of NDM-I from our hospital and the continuous spread, even in other sequence types, of OXA-48 (unpublished data).

To our knowledge, our description of carbapenemase coproduction is the first to be reported in the area of Valencia. Moreover, the occurrence of two simultaneous different outbreaks of coproducing *K. pneumoniae* is exceptional in the literature. Further and deeper studies on this subject are needed, as these findings emphasize the importance of systematic detection in order to contain the spread of these multidrug-resistant organisms.

Conflict of Interest

None declared.

References

- [1] Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clin Infect Dis* 2017;65: 208–15.
- [2] Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41:252–75.
- [3] Ferreira Roumayne L, da Silva Brenda CM, Graziela GS, Nakamura-Silva R, Pitondo-Silva A, Campanini EB, et al. High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. *Front Microbiol* 2019;9:3198.
- [4] Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:565–91.
- [5] Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Dalko GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013; 13:785–96.
- [6] Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:821–30.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI guidelines. Available at: <https://clsi.org/>.
- [8] Pfennigwerth N, Kaminski A, Korte-Berwanger M, Pfeifer Y, Simon M, Werner G, et al. Evaluation of six commercial products for colistin susceptibility testing in *Enterobacteriales*. *Clin Microbiol Infect* 2019;25: 1385–9.
- [9] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. Available at: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
- [10] Cetinkol Y. The investigation of oxacillinase/metallo-beta-lactamase genes and clonal analysis in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infez Med Italy* 2016;24:48–53.
- [11] Carattoli A. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy. *J Clin Microbiol* 2008;46:103–8.
- [12] Gautom RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol* 1997;35:2977–80.
- [13] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–9.
- [14] PCR based replicon typing: PBRT KIT–PCR-based replicon typing. Available at: <https://www.diatheva.com/molecular-biology/pcr-based-replicon-typing/pbrt-2-0-kit-details>.
- [15] Barguigua A, El Omani F, Lakbakbi El Yaagoubi F, Talmi M, Zerouali K, Timinouni M. First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco. *APMIS* 2013;121:675–7.
- [16] Nasr A Ben, Decré D, Compain F, Genel N, Barguieill F, Arlet G. Emergence of NDM-1 in association with OXA-48 in *Klebsiella*

- pneumoniae* from Tunisia. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:4089–90.
- [17] Seiffert SN, Marschall J, Perreten V, Carattoli A, Furrer H, Endimiani A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *J Antimicrob Agents* 2014;44:260–2.
- [18] Pirs M, Cerar Kišek T, Križan Hergouth V, Seme K, Mueller Premru M, Jeverica S, et al. Successful control of the first OXA-48 and/or NDM carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in Slovenia, 2014–2016. *J Hosp Infect* 2019;101:142–9.
- [19] David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol* 2019;4:1919–29.
- [20] Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4398–401.
- [21] Snitkin ES, Zelazny AM, Thomas PJ, Stock F, NISC Comparative Sequencing Program Group. Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med* 2012;4:148rr116.
- [22] Seara N, Oteo J, Carrillo R, Pérez-Blanco V, Mingorance J, Gómez-Gil R, et al. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46:169–73.
- [23] Jacobs DM, Safir MC, Huang D, Minhag F, Parker A, Rao GG. Triple combination antibiotic therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2017;16:76.
- [24] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–81.
- [25] Petrosillo N, Taglietti F, Granata G. Treatment options for colistin resistant *Klebsiella pneumoniae*: present and future. *J Clin Med* 2019;8:E934.
- [26] Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2227–38.
- [27] Mathers AJ, Cox HL, Kitchel B, Bonatti H, Brassinga AKC, Carroll J, et al. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *mBio* 2011;2:e00204–11.
- [28] Ho PL, Lo WU, Yeung MK, Lin CH, Chow KH, Ang I, et al. Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong. *PLoS One* 2011;21:e17989.
- [29] Novais A, Cantón R, Moreira R, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-I-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-I, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:796–9.
- [30] Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:2420–3.
- [31] Mo Y, Hernandez-Koutoucheva A, Musicha P, Bertrand D, Lye D, Ng OT, et al. Carriage duration of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a hospital cohort—implications for infection control measures. In press. Available at: <https://europepmc.org/article/PPR/PPR86839>.
- [32] Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1597–606.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Global Antimicrobial Resistance

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jgar

Molecular epidemiology and drug-resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in patients from a tertiary hospital in Valencia, Spain

Begoña Fuster^{a,*}, Carme Salvador^a, Nuria Tormo^a, Neris García-González^c, Concepción Gimeno^{a,b}, Fernando González-Candelas^{c,d}

^a Microbiology Department, Valencia General University Hospital, Valencia, Spain

^b Faculty of Medicine, University of Valencia, Valencia, Spain

^c Joint Research Unit (Infection and Public Health), FISABIO, University of Valencia, Institute for Integrative Systems Biology (I2SysBio), Valencia, Spain

^d CIBER Epidemiology and Public Health, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2019

Received in revised form 16 March 2020

Accepted 6 May 2020

Available online 22 May 2020

Keywords:

Klebsiella pneumoniae
Resistance mechanisms
Carbapenemases

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study has been to characterize carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates and to determine the resistance mechanisms involved, the clonal relationship between strains and clinical and demographical data of the infected patients.

Methods: Clinical and demographical data from patients were collected and statistically analysed. Antimicrobial susceptibility testing was performed and resistance genes were detected both phenotypically and genotypically. Conjugation assays were performed to show horizontal transferability of resistance genes. Clonal relationship was also studied. Next-generation sequencing (NGS) was performed to obtain information regarding resistance genes, sequence types, virulence factors and plasmid types.

Results: Statistical significance was shown by the presence of an infection if there had been a previous hospital stay; urinary catheter carriage and chronic renal disease also indicated higher probabilities of being infected. More than 95% of the isolates were non-susceptible to third-generation cephalosporins, and more than 90% were non-susceptible to quinolones. Phenotypic and genotypic methods for resistance detection were concordant and later confirmed by NGS. This is the first detection of OXA-48, NDM-1 and CTX-M-15 co-production in the area. No plasmid-mediated colistin resistance was found. Tetracycline, sulfonamides and aminoglycoside resistance genes were found in almost all the isolates studied. No virulence factors were detected. Multilocus sequence typing showed more than 15 different sequence types, with ST101, ST307 and ST11 being the most prevalent.

Conclusions: This study is the first to report such a large group of OXA-48 carbapenemases with clonal dissemination among carbapenem-resistant *K. pneumoniae* in Valencia. This is also the first detection of OXA-48, NDM-1 and CTX-M-15 co-production in the area.

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Antimicrobial Chemotherapy. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Klebsiella pneumoniae, a member of the Enterobacteriaceae family, is naturally present in the human and animal gastrointestinal tract [1]. However, it is the most common aetiological agent of nosocomial and community-acquired infections. Pathogenic *K. pneumoniae* strains have the potential to cause a wide variety of

infectious diseases, including urinary tract, respiratory tract and blood infections [2].

Furthermore, the emergence and dissemination of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKP) strains has posed an urgent threat to public health on a global scale. Carbapenem resistance in *K. pneumoniae* is mainly owing to the acquisition of carbapenemase genes associated with mobile elements such as plasmids. In fact, CRKP strains are characterized by multiantibiotic-resistance profiles that involve most β -lactams, including carbapenems, along with other non β -lactam antibiotics, limiting therapeutic options and affecting the clinical outcome of infections, with high mortality rates reported in some categories of patients [3].

* Corresponding author at: Valencia General University Hospital, Av. Tres Cruces, 2, 46014 Valencia, Spain.

E-mail address: begona.fuster@gmail.com (B. Fuster).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2020.05.002>

2213-7165/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Antimicrobial Chemotherapy. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Specific virulence factors associated with CRKP have not been reported. However, risk factors associated with the acquisition of CRKP include prolonged hospitalization, intensive care unit (ICU) stay, invasive devices, immunosuppression and multiple antibiotic treatment before initial infection [4].

Since 2015, we noticed a marked increase in the number of clinical isolates of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems in our hospital, which is a university hospital located in Valencia (eastern part of Spain), with a total capacity of 500 beds. Since then, an active surveillance programme for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, using axillar-rectal and pharyngeal swabs for patients admitted to the ICU has been ongoing. The objective of this study has been to investigate the clinical and microbiological characteristics of CRKP isolates collected in our hospital from 2015 until 2018, either from clinical samples and/or the active surveillance programme.

2. Methods

We conducted a retrospective study from 2015 until 2018 at the microbiology department of the Valencia General Hospital, including isolates of *K. pneumoniae* that were found to be non-susceptible to any of the carbapenems tested. Only one sample per patient was included in this study, usually the first one.

2.1. Demographical and clinical data of patients infected and/or colonized with CRKP

The following information about the patients was collected and saved in a database for further statistical analysis with MedCalc online software [5]:

- Hospital ward
- Previous hospitalization (less than 6 months)
- Type of infection:
- Healthcare associated: occurring in a patient after 48 h or more after hospitalization or within 30 days after having received healthcare [6].
- Community-acquired infection: diagnosed within 48 h of admission in patients without any previous encounter with healthcare [7].
- Recent antibiotic therapy (less than 30 days)
- Underlying conditions
- Diabetes mellitus
- Chronic renal disease
- Cirrhosis
- Chronic pulmonary diseases
- Functional or structural uropathology
- Urinary catheter
- Previous colonization (pharyngeal or axillar-rectal)
- Acute events during hospitalization:
- Sepsis
- Pneumonia (associated or not to mechanical ventilation)
- Surgical event or complication (less than 30 days)
- Treatment adequacy: directed treatment considering in vitro susceptibilities, source of infection and adequacy to guidelines.

2.2. Identification, antimicrobial susceptibility testing and phenotypic detection of carbapenemase production

2.2.1. Identification and antimicrobial susceptibility testing

All isolates were initially identified by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) Bruker (Billerica, Massachusetts, United States) and

biochemical testing (MicroScan Walkaway, Beckman Coulter (Brea, California, United States)).

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of ampicillin, amoxicillin and clavulanate, amikacin, cefepime, cefotaxime, cefoxitin, ceftazidime, cefuroxime, ciprofloxacin, colistin, ertapenem, fosfomycin, gentamicin, imipenem, norfloxacin, piperacillin-tazobactam, tigecycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, meropenem and levofloxacin were obtained using the microdilution automated system MicroScan Walkaway (Beckman Coulter) [8]. The antibiotics tested varied depending on the origin of the sample. Susceptibility breakpoints were interpreted according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [9]. *Escherichia coli* ATCC 25922 was used for quality control. All isolates were frozen for preservation at -80°C in an adequate medium for posterior analyses.

2.2.2. Phenotypic detection of carbapenemases

2.2.2.1. β -Carbatest (BioRad). The β -Carbatest was performed on all strains that were found to be non-susceptible to at least one carbapenem. It consists of a qualitative colorimetric test based on colour change when hydrolysis of the imipenem β -lactam ring occurs. When there is a change in colour from yellow to orange/red (Fig. 1), the test is considered positive [10].

2.2.3. Inhibitor-based approach

The inhibitor-based tests were also performed on all strains found to be intermediate or resistant to at least one carbapenem. These tests rely on the ability of certain compounds to inhibit the carbapenemase activity specifically. Thus, metallo- β -lactamase activity is inhibited by ethylenediaminetetraacetic acid and dipicolinic acid (which are chelating agents) and boronic acid inhibits *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzymes. Cloxacillin, however, is used to differentiate AmpC β -lactamase production. The addition of a temocillin disk has been proposed as a surrogate marker of OXA-48 and functionally related variants. Examples of these tests are shown in Fig. 2 [11].

2.2.4. Phenotypic detection of hypervirulent strains: string test

The string test is a widely used marker for hypervirulent *K. pneumoniae* strains. It is considered positive when it is possible to generate a viscous string >5 mm in length from a bacterial colony using an inoculation loop [12]. The test was performed on all the strains that were found to be non-susceptible to at least one carbapenem.

2.2.5. Molecular detection of resistance genes

Carbapenemase genes (Class A [bla_{KPC}], Class B [bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{NDM}]), plasmid-encoding AmpC (bla_{CMY} , bla_{DHA} and bla_{MOX}) and extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes (bla_{CTX-M}) were detected by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-

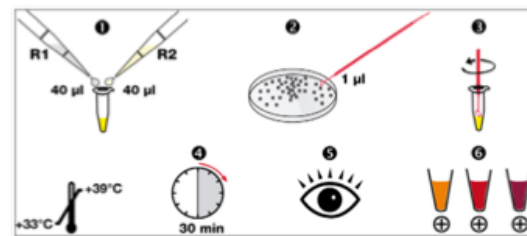


Fig. 1. Procedure for the detection of carbapenemase activity [10]. R1: Reactive 1; R2: Reactive 2.

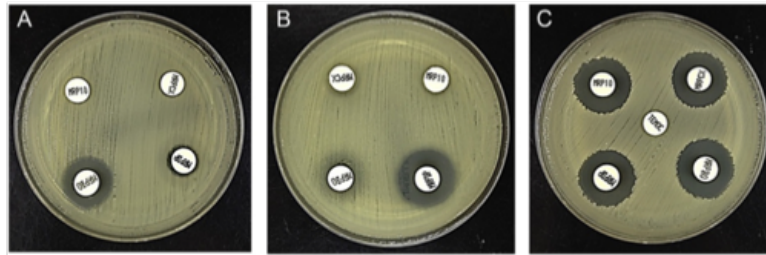


Fig. 2. (A) Positive for KPC production. (B) Positive for metallo- β -lactamase activity. (C) Positive for OXA-48 production [10]. KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

based system named Eazyplex (Amplex[®] Biosystems GmbH, Giessen, Germany).

The Eazyplex SuperBug CRE system is a qualitative genotypic diagnostic test consisting of a freeze-dried, ready-to-use mixture for an isothermal amplification reaction that covers carbapenemase variants of the VIM (-1 to -37), NDM (-1 to -7) and KPC (-2 to -15) families, part of the OXA-48 family (-48, -162, -204 and -244), OXA-181 and the CTX-M ESBL families (CTX-M-1 group [CTX-M-1, CTX-M-3 and CTX-M-15] and CTX-M-9 group) from Gram-negative bacteria. Amplification products that generated LAMP were visualized by real-time fluorescence measurement of a fluorescent dye bound to double-stranded DNA using the GENIE II instrument (OptiGene, Horsham, UK) [13].

2.2.6. Conjugation assays

The conjugation transfer assay was performed in broth culture using azide-resistant *E. coli* J53 as the recipient. The recipient cells were grown at 37 °C in fresh brain–heart infusion broth (5 mL) containing sodium azide (100 μ g/mL) for 24 h. In this case, the donor strains were two isolates of *K. pneumoniae* NDM-1 and CTX-M-1 producer. The donor cells were grown overnight at 37 °C in brain–heart broth. Donor and recipient cells were mixed at a ratio of 1:10 (donor/recipient) and incubated at 37 °C for at least 4 h. The cell suspension was inoculated in agar plates containing ertapenem (1 μ g/mL) and supplemented with sodium azide (100 μ g/mL). The colonies grown on the selection media were selected and the species were identified using MALDI-TOF/MS as previously described. Manual disk-diffusion antimicrobial susceptibility testing of β -lactams and non- β -lactams such as trimethoprim-sulfamethoxazole, ciprofloxacin and colistin [14] was performed, together with the isothermal amplification for the detection of *bla* genes to confirm horizontal resistance gene transfer as previously described.

2.2.7. Pulsed-field gel electrophoresis

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was performed on 150 isolates, which were selected following sequence-type analysis. The preparation of the plugs and digestion with *Xba*I Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, United States) was performed according to Romesh K. Gautam protocol [15]. The DNA fragments were separated by electrophoresis using a CHEF-DR III apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). DNA samples from *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad Laboratories) were used as molecular size markers. The PFGE patterns were analysed using Bionumerics 7.6 software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). PFGE patterns were assigned to clusters according to the criteria proposed by Tenover et al. [16].

2.2.8. Next-generation sequencing applied to clinical microbiology

Genomic DNA was purified from all strains using a DNA extraction kit, MagCore[®] Automated Extraction System (RBC

Bioscience (New Taipei City, Taipei)). DNA libraries were prepared using the Nextera XT sample preparation method and sequenced with a NextSeq instrument (Illumina (San Diego, California, United States)) [17].

2.2.8.1. Multilocus sequence typing analysis. Multilocus sequence typing (MLST) was determined using a BLAST-based approach with ARIBA (Antimicrobial Resistance Identification from Assembly) [18] using the short reads (150 bp, paired-ends) derived for each strain.

2.2.8.2. Antimicrobial resistance genes, virulence factors and plasmid detection. Resistance to β -lactams and non- β -lactam antibiotics, virulence factors and replicon genes were detected using the short reads derived by next-generation sequencing (NGS). This analysis was also performed with ARIBA, which uses a combined mapping/alignment and targeted local assembly approach to identify antimicrobial resistance (AMR) genes and variants efficiently and accurately from paired sequencing reads. ARIBA includes support for a number of public databases. ResFinder [19], PlasmidFinder [20] and Virulence Finder database (VFDB) [21] were used for the identification of corresponding factors in our samples.

2.2.8.3. Statistical analyses. Bivariate analyses were performed to obtain the odds ratio of the different factors considered using MedCalc online software [5]. A confidence interval of 95% and a *P*-value < 0.05 was established as cut-off values.

3. Results

3.1. Demographics and clinical features

A total of 1013 CRKP strains (including clinical and surveillance isolates) corresponding to 234 patients were isolated from January 2015 to December 2018 at the Valencia General Hospital (Spain). Only patients at the ICU underwent active surveillance at the moment of admission and once per week (axillar-rectal and pharyngeal swab culture), according to the protocols established in our hospital.

Among the 234 patients enrolled, 135 were male (58%). The age range was 26–99 years (72.01 \pm 14.11). The distribution according to the different wards of the hospital is shown in Fig. 3.

Of the 1013 CRKP isolates, 607 (60%) were obtained from surveillance cultures, whereas 406 (40%) were collected from clinical specimens (Fig. 4), including 58% (234 of 406) from urine, 7% (30 of 406) from respiratory samples and 7% (27 of 406) from blood samples.

A total of 150 CRKP-infected patients (64.1%) were detected. Previous colonization with CRKP was observed in 60 infected patients (40%), but only information about previous colonization

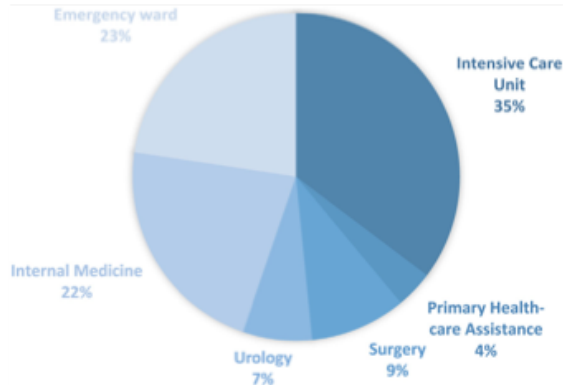


Fig. 3. Distribution of the patients colonized and/or infected by CRKP among the different wards. CRKP, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*.

was collected from patients who had had a previous stay in the ICU. Most of them had the same *K. pneumoniae* isolate in more than one sample; 49 had sepsis at some point (not all of them were microbiologically diagnosed), and 16 had pneumonia (50% were associated with assisted ventilation).

Among the CRKP-infected patients, almost 50% had previously been admitted to the hospital, and the ones who had not had other risk factors such as having a urinary catheter, previous antibiotic treatment and/or surgery complications.

A bivariate analysis was performed to find a significant difference in suffering an infection by CRKP (Table 1). The different risk factors were studied and the results showed that there was statistical significance with an odds ratio higher than 1 in suffering an infection if there had been a previous hospital stay. Regarding the risk factors related to the patient, there was also statistical significance for patients carrying a urinary catheter and patients with chronic renal disease, showing higher probability for suffering a CRKP infection. Regarding the other risk factor studies, although the odds ratio was higher than 1, it could not be statistically proven.

Regarding the classification of the infection-type distribution depending on its origin (Fig. 5), only 16% of the infections caused by CRKP in all 234 patients were acquired in the community (37/234), 84% being related to hospitalization (197/234).

Table 1
Bivariate analyses of risk factors associated with CRKP infection.

Risk factor	Odds ratio	95% CI	P-value
Previous antibiotic therapy	1.529	0.899–2.601	0.12
Previous hospital stays	3.071	1.677–5.626	<0.001
Surgery	1.615	0.927–2.815	0.09
Diabetes mellitus	1.491	0.819–2.715	0.19
Chronic renal disease	5.482	2.811–10.691	<0.001
Chronic pulmonary disease	1.038	0.511–2.108	0.92
Neoplasia	1.04	0.567–1.907	0.9
Structural or functional uropathology	2.34	0.643–8.568	0.19
Urinary catheter	2.57	1.323–4.994	0.0053

CRKP, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*.

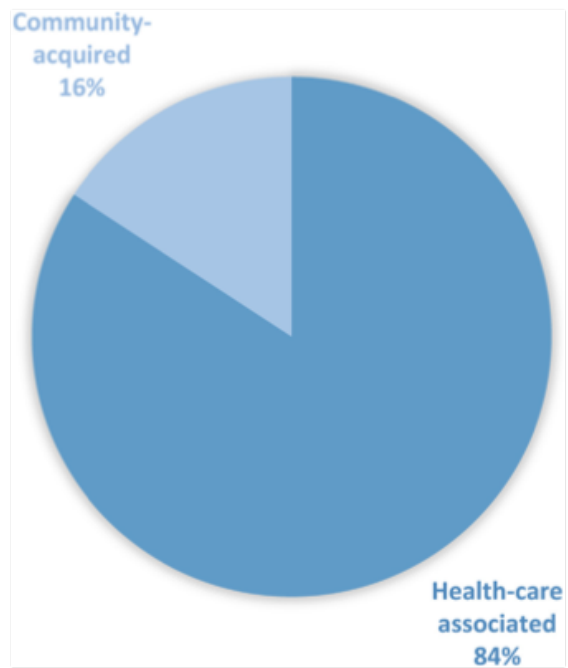


Fig. 5. Infection-type distribution.

3.2. Antimicrobial susceptibility testing and phenotypic detection of carbapenemase production

3.2.1. Antimicrobial susceptibility testing

Susceptibility testing of the 234 strains revealed that more than 95% were non-susceptible to third-generation cephalosporins

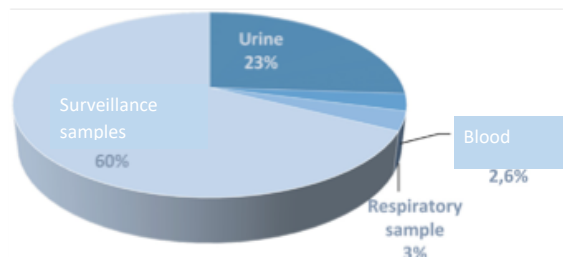


Fig. 4. Sample distribution.

(MICs > 4 mg/L), and more than 90% were also non-susceptible to quinolones. Resistance to imipenem, meropenem and ertapenem in all the isolates was variable (MICs ranging from 1 to >8 mg/L). A moderate frequency of resistance, around 50%, was shown to tigecycline (MICs > 2 mg/L), gentamicin (MIC > 4 mg/L) and fosfomicin (MICs > 32 mg/L). Circa 30% of the isolates presented resistance towards trimethoprim–sulfamethoxazole. Colistin turned out to be the antibiotic with the highest susceptibility rates (all MICs < 2 mg/L).

The distribution of antimicrobial susceptibility of all CRKP isolates is shown in Table 2.

3.3. Phenotypical detection of carbapenemases

3.3.1. β-Carabatest (BioRad)

The β-Carabatest was performed on the 234 strains. All the strains which were carbapenemase producers (199/234) were positive for the test. AmpC β-lactamase producers and ESBL-producer strains were β-Carabatest negative.

Table 2Resistance rates against 20 antimicrobial agents assessed in 234 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates.

Antimicrobial family	Antimicrobial agent	Susceptibility (%)	Antimicrobial family	Antimicrobial agent	Susceptibility (%)
β-Lactams	Amoxicillin-clavulanate (n = 234)	0.85	Quinolones	Ciprofloxacin (n = 234)	5.5
	Cefepime (n = 185)	15.6		Levofloxacin (n = 233)	6
	Cefotaxime (n = 226)	4.4		Norfloxacin (n = 54)	3.7
	Cefoxitin (n = 193)	26.4	Aminoglycosides	Amikacin (n = 234)	70.1
	Ceftazidime (n = 234)	4.7		Gentamicin (n = 234)	41.0
	Cefuroxime (n = 231)	2.6		Tobramycin (n = 234)	28.2
	Ertapenem (n = 227)	3.1		Polymyxin	Colistin (n = 120)
	Imipenem (n = 234)	51.7	Tetracycline		Tigecycline (n = 179)
	Piperacillin/tazobactam (n = 234)	3	Sulfonamides	Trimethoprim-sulfamethoxazole (n = 233)	27.5
	Meropenem (n = 234)	52.6	Fosfomycin	Fosfomycin (n = 92)	46.7

3.3.2. Inhibitor-based approach

The test was performed on all the strains. One hundred and thirty-six strains were resistant to temocillin, suggesting OXA-48 production. Seventeen strains were resistant to temocillin and susceptible to meropenem + dipicolinic acid, suggesting co-production of OXA-48 and NDM; 15 strains were susceptible to cloxacillin being classified as AmpC producers, and 29 strains were susceptible to meropenem + dipicolinic acid, suggesting NDM-1 production.

3.4. String test

The test was applied to all of the 234 isolates, with only 2 positive results that were not later confirmed with NGS (see section 8).

3.5. Detection of resistance genes by PCR

All the antibiotic resistance genes found in the 234 isolates studied are shown in Table 3.

3.6. Conjugation assays

Selected carbapenemase-encoding plasmids were successfully transferred to a laboratory strain of azide-resistant *E. coli* J53. The carbapenemase-producing transconjugants expressed resistance to all β-lactams with carbapenemase phenotypes, similar to the one observed in the parental strains. Genotypic confirmation of the selected NDM-1 carbapenemase-positive (and CTX-M-1 producer) strain transconjugant was performed by isothermal amplification as previously described.

3.7. Pulsed-field gel electrophoresis

Macro-restriction analysis was performed with 130 CRKP isolates belonging to the main sequence-types detected (ST101, ST11 and ST307) and 20 CRKP isolates representing the other sequence types (STs) in this study. The analysis revealed 19

Table 3

Resistance genes detected by PCR in all 234 isolates.

Resistance genes	n (%)
β-Lactamase genes only	3 (1.3)
AmpC β-lactamase genes	5 (2.1)
	10 (4.2)
	1 (0.4)
	9 (4)
Carbapenemase genes +/- β-lactamase genes	29 (12.5)
	85 (36.5)
	51 (22)
	17 (7.5)
No resistance genes detected	19 (8.5)

different profiles, which were grouped into 18 PFGE clusters. The predominant clusters were clone A (n = 22) corresponding to ST101, clones B1 (n = 22) and B2 (n = 27) belonging to ST11 but unrelated according to Tenover's criteria [16], and clones C1 (n = 37) and C2 (n = 22) belonging to ST307, which are possibly related according to band differences. The remaining PFGE clusters contained fewer than four isolates. In Fig. 6 different band patterns can be observed.

3.8. Next-generation sequencing analysis

3.8.1. MLST analysis

Sixteen STs were identified using MLST. The major type was ST307, followed by ST11 and ST101. Other STs included six or fewer isolates in each ST. All isolates in the major PFGE clusters (clones B1 and B2, clones C1 and C2 and clone A) belonged to ST307, ST11 and ST101, respectively. Thirty-three isolates were typed as novel STs, with each one being different from the other (Fig. 7).

3.8.2. Distribution of ESBL, AmpC plasmid-mediated and carbapenemase genes

The analysis of the resistome of the 234 isolates accounted for most of their resistance traits. The presence of genes encoding ESBL, AmpC plasmid-mediated and carbapenemase genes was confirmed by next-generation sequencing. Two hundred and

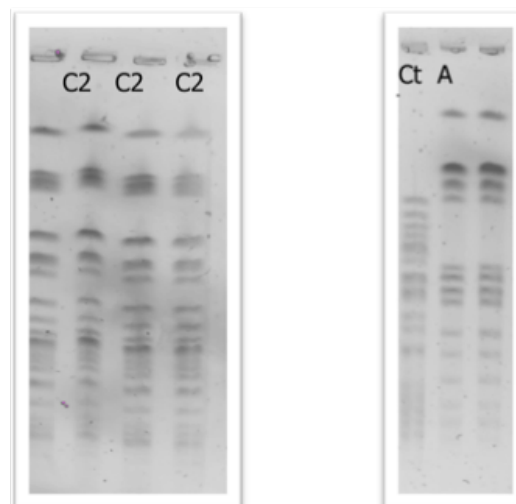


Fig. 6. Different band patterns obtained after performing PFGE. Ct (Control) = ATCC 25922 *Escherichia coli*. PFGE, pulsed-field gel electrophoresis.



Fig. 7. Distribution of the sequence types found after performing MLST analysis. MLST, multilocus sequence typing.

thirteen isolates (91%) were positive for carbapenemase genes, including *K. pneumoniae* OXA-48 ($n = 136$, 60%), NDM-1 ($n = 29$, 12%) and co-production of OXA-48 and NDM-1 ($n = 17$, 7%). The prevalence of co-production of carbapenemases, ESBL and AmpC β -lactamases is detailed in Table 4.

3.8.3. Resistance to non- β -lactam antibiotics

Non- β -lactam resistance genes were also studied by applying NGS, and the results are shown in Table 4. In all 234 isolates resistance to quinolones was detected, mainly mediated by *Qnr* genes and efflux pumps such as *Oqx*. Regarding polymyxin resistance, no plasmid-mediated colistin resistance was found. Tetracycline resistance genes, together with sulfonamides and aminoglycoside resistance genes were also detected in almost all the isolates studied.

3.9. Virulence factors and plasmid analyses

No virulence factors were detected among the 234 isolates of CRKP. Regarding plasmid analysis, the different incompatibility

groups found are shown in Table 4. In all the strains harbouring OXA-48, an IncL/M type replicon was detected, as previously described in the literature [22]. On the other hand, in those strains co-producing OXA-48 and NDM-1 carbapenemases, two replicon types were found, of types IncL/M and IncFIB. Other replicon types such as IncFII, IncQ, IncHI2, IncN and IncR were also detected in strains harbouring AmpC β -lactamase genes and other non- β -lactam resistance genes.

4. Discussion

CRKP strains pose a significant public health threat as they can quickly spread in hospital settings. Carbapenem resistance due to carbapenemase production is of serious concern due to the high level of resistance of these strains, not only to β -lactams but also to other antimicrobial drugs, such as aminoglycosides or quinolones. Infections caused by these multidrug-resistant microorganisms are associated with more adverse clinical outcomes and higher mortality rates [23].

This study describes the clinical epidemiology of the patients infected and/or colonized by CRKP, the phenotypic and genotypic features of the isolates and the molecular mechanisms involved in the acquisition and dissemination of CRKP at a tertiary hospital in Valencia (Spain). More than 80% of the isolates were recovered from hospitalized patients, which shows that CRKP infection and/or colonization is more likely to be nosocomial than community-acquired as it has already been described in the literature [24].

Regarding the clinical features of the patients in this study, suffering a CRKP infection was more likely when patients underwent surgery or a surgery complication, if patients had had previous hospital stays and if patients had chronic renal disease ($P < 0.05$). Other risk factors also showed higher probability but were not statistically significant, probably owing to the low number of patients.

Table 4
PFGE patterns, sequence types, replicon typing, presence of carbapenemase, CTX-M, DHA-1, SHV-11 and other non- β -lactam resistance genes assessed for 135 carbapenem-resistant isolates of *K. pneumoniae* belonging to major circulating clones.

Strains	Year of isolation	PFGE	MLST	Carbapenemases found	CTX-M	DHA-1	SHV-11	Other resistance genes	Replicon typing
22	2016–2017	A	ST101	OXA-48 NDM-1 OXA-48 + NDM-1	CTX-M-1 CTX-M3 CTX-M15	DHA-1	SHV-11	<i>ArmA</i> <i>mphA</i> <i>TetR</i> <i>Qnr</i> <i>Dfr</i>	IncL/M IncQ IncFIB IncFII IncR
37	2015–2018	B1	ST307	OXA-48	CTX-M-15	–	SHV-28 SHV-106	<i>TetR</i> <i>Qnr</i> <i>Dfr</i>	IncL/M IncFI
22	2015–2018	B2	ST307	OXA-48	CTX-M-15	–	SHV-28 SHV-106	<i>TetR</i> <i>Qnr</i> <i>Dfr</i>	IncL/M IncN IncFI
22	2015–2018	C1	ST11	OXA-48	CTX-M-1 CTX-M3 CTX-M15	DHA-1	SHV-11	<i>ArmA</i> <i>mphA</i> <i>TetR</i> <i>Qnr</i> <i>Dfr</i>	IncL/M IncQ IncFIB IncFII IncR
27	2015–2018	C2	ST11	OXA-48	CTX-M-1 CTX-M3 CTX-M15	DHA-1	SHV-11	<i>ArmA</i> <i>mphA</i> <i>TetR</i> <i>Qnr</i> <i>Dfr</i>	IncL/M IncQ IncFIB IncFII IncR
3	2016–2017	D1	ST437	OXA-48 NDM-1	CTX-M-15 CTX-M32	–	SHV-11	<i>mphA</i> <i>TetR</i> <i>Qnr</i> <i>Dfr</i>	IncFIB IncFI IncL/M IncR
2	2016–2017	D2	ST437	OXA-48 NDM-1	CTX-M-15 CTX-M-32	–	SHV-11	<i>mphA</i> <i>TetR</i> <i>Qnr</i> <i>Dfr</i>	IncFIB IncFI IncL/M IncR

MLST, multilocus sequence typing; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis.

Susceptibility testing showed co-resistance to non- β -lactam antibiotics, limiting treatment options to polymyxins, fosfomicin and amikacin in many cases. Interestingly, strains from the same cluster showed similar susceptibility patterns. Regarding the different STs found, ST101 was the only one harbouring both OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. OXA-48 was found in ST11, ST437 and ST307, which were also among the most prevalent STs in our settings. In all NDM-1 producers, the *RmtF* gene that confers resistance to aminoglycosides was always detected, as previously described in the literature [25].

Phenotypic and genotypic methods showed 100% concordance: all the strains producing carbapenemase were correctly detected in the first instance by phenotypic methods and later confirmed by both isothermal amplification and next-generation sequencing.

Our results regarding epidemiological relationships show extensive clonal dissemination throughout the years. It is important to mention that the three major clones that have been circulating since 2015 or 2016 in our hospital, ST307, ST11 and ST101, have acquired and lost different plasmid-mediated resistance genes, and were still isolated in patients in 2018. However, in 2015 all the CRKP that were isolated belonged to ST11 and most of them harboured DHA-1 AmpC genes, whereas since 2016 there was a change in ST and carbapenemase genes: OXA-48 arose and NDM-1 appeared for the first time in our settings, coinciding with the arrival of a patient from Pakistan carrying an NDM-1-producing *K. pneumoniae*. From this moment, ST11 was replaced by ST307, ST437 and ST101, among others.

Data found in the literature suggest that CRE-producing OXA-48 are more prevalent in Europe and the Mediterranean region [26]. The prevalence of CRKP strains that produce the OXA-48-enzyme and NDM-1 metallo- β -lactamase is gradually increasing because of clonal dissemination and horizontal gene transfer.

After the conjugation assays were performed, the selected carbapenemase-producing transconjugants were detected that carried the gene and expressed carbapenemase activity, similar to their parental strains, suggesting that carbapenem resistance genes are located on self-transferable plasmids. In addition, OXA-48 is located on the IncL/M plasmid and NDM-1 is located on the IncF and IncX group, similar to that previously reported [27].

The co-existence of genes coding for at least two classes of carbapenemase in *K. pneumoniae* has been reported worldwide [28], but co-harboring OXA-48 and NDM-1 metallo- β -lactamase is infrequently reported [29], with few reports worldwide and none in the area of the Valencian Community. To the best of our knowledge, this study is the first to report such a large group of OXA-48 carbapenemases with clonal dissemination among CRKP in Valencia (Spain). It is also the first detection of OXA-48, NDM-1 and CTX-M-15 co-production in the area.

In conclusion, *K. pneumoniae* with carbapenemases, ESBLs and AmpC beta-lactamases may be an emerging high-risk multidrug-resistant microorganism. It is important to mention that a single strain of ST307 CRKP harbouring two classes of carbapenemase genes (*bla*_{OXA-48} and *bla*_{NDM-1}) has not previously been identified in other hospitals in Valencia. The strains producing ESBLs genes plus only one carbapenemase, also described in this study, may already be far more prevalent than believed previously, especially regarding OXA-48 and CTX-M-1, which have already been widely reported in Spain.

Funding

This project was partly funded by projects BFU2017-89594R from MICIN (Spanish Government) and PROTOMETO2016-0122 (Generalitat Valenciana, Spain). Whole-genome sequencing (WGS) was performed at Servicio de Secuenciación Masiva y Bioinformática de la Fundación para la Investigación Sanitaria y

Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO) and co-financed by the European Union through the Operational Programme of European Regional Development Fund (ERDF) of the Valencia Region (Spain) 2014–2020.

Conflict of interests

None declared.

Ethical approval

Not required.

References

- [1] Tekeli A, Dolapci I, Evren E, Oguzman E, Karahan ZC. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC and NDM-1 carbapenemases from Turkey. *Microb Drug Resist* 2020;26:118–25. doi:<http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2019.0086>.
- [2] Candan ED, Aksöz N. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Acta Biochimica Polonica* 2015;62:867–74. doi:http://dx.doi.org/10.18388/abp.2015_1148.
- [3] Avgouleas K, di Pilato V, Zarkotou O, Sennati S, Politi L, Cannatelli A, et al. Characterization of extensively drug-resistant or pandrug-resistant sequence type 147 and 101 OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infections in patients in an intensive care unit. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:e02457–17. [Accessed 26 September 2019] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29661874>.
- [4] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9:228–36. [Accessed 26 September 2019] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19324295>.
- [5] <https://www.medcalc.org/medcalc>. Software. MedCalc - User-friendly statistical software. [Accessed 26 September 2019].
- [6] Haque M, Sartelli M, McKimm J, Bakar MA. Health care-associated infections – an overview. *Infect Drug Resist* 2018;11:2321–33.
- [7] <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/community-acquired-infection>. Petrosillo N, Drapeau CM, Di Bella S. Community acquired infection. [Accessed 1 October 2019].
- [8] Beckman Coulter. MicroScan WalkAway plus System. <https://www.beckman-coulter.com/es/products/microbiology/microscan-walkaway-plus-system>. [Accessed 26 September 2019].
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI guidelines. <https://clsi.org/>. [Accessed 26 September 2019].
- [10] <https://www.bio-rad.com/en-uk/SearchResults?Text=apid+detection+of+carbapenemase-producing+Enterobacteriaceae+strains> Bio-Rad Laboratories, Inc. β CARBA Test - 68260 - Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae strains, 25 tests. [Accessed 26 September 2019].
- [11] Aguirre-Quilónero A, Martínez-Martínez L. Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Infect Chemother* 2017;23:1–11. [Accessed 26 September 2019] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27769646>.
- [12] Russo TA, Olson R, Fang CT, Stoesser N, Miller M, MacDonald U, et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2018;56:e00776–18.
- [13] Escrivá BF. Eazyplex® SuperBug CRE system for the rapid detection of carbapenemase and extended spectrum beta-lactamase genes in gram-negative bacteria. <https://www.oatext.com/eazyplex-superbug-cre-system-for-the-rapid-detection-of-carbapenemase-and-extended-spectrum-beta-lactamase-genes-in-gram-negative-bacteria.php>. [Accessed 1 October 2019].
- [14] American society of Microbiology Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>. [Accessed 26 September 2019].
- [15] Gautam RK. *Escherichia coli* Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol* 1997;35:2977–80. [Accessed 1 October 2019] <http://jcm.asm.org/>.
- [16] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233–9.
- [17] <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/nextseq-550-system-spec-sheet-770-2013-053-translations/nextseq-550-system-spec-sheet-770-2013-053-esp.pdf> Illumina. Next-Seq Sequencing System 550 (brochure). [Accessed 1 October 2019].
- [18] Hunt M, Mather AE, Sánchez-Busó L, Page AJ, Parkhill J, Keane JA, et al. ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microb Genom* 2017;3:e000131.
- [19] Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2640–4.

- [20] Voldby M, Møller F, Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Larsen MV, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3895–903.
- [21] Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, et al. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res Spec Publ* 2005;33:325–8. . [Accessed 1 October 2019] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608208>.
- [22] Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:559–62.
- [23] Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!. *Trends Mol Med* 2012;18:263–72.
- [24] Kang CI, Kim SH, Bang JW, Kim HB, Kim NJ, Kim EC, et al. Community-acquired versus nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance. *J Korean Med Sci* 2006;21:816–22.
- [25] Gamal D, Fernández-Martínez M, Salem D, El-Defrawy I, Montes LÁ, Ocampo-Sosa AA, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Egypt containing blaNDM-1 on IncR plasmids and its association with rmtF. *Int J Infect Dis* 2016;43:17–20.
- [26] Girmenia C, Serrao A, Canichella M. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in Mediterranean countries. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2016;8:e2016032.
- [27] Paskova V, Medvecký M, Skalova A, Chudejova K, Bitar I, Jakubu V, et al. Characterization of NDM-encoding plasmids from Enterobacteriaceae recovered from Czech hospitals. *Front Microbiol* 2018;9:1549.
- [28] Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol* 2016;7:895.
- [29] Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem resistance: a review. *Res J Med Sci* 2017;6:1.

IX. Bibliografía

1. Edwin Klebs. Beiträge zur Kenntniss der pathogen Schystomyceten, VII. ARCH EXP PATHOL PHARMAKOL. 1960;4:409–88.
2. Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E. The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass. Springer Science & Business Media; 2006.
3. Friedländer C. Mikkrokken der pneumonie. Fortschr Med. 1883;1:715–33.
4. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51(3):925-32.
5. Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51(3):915-24.
6. Lenchenko E, Blumenkrants D, Sachivkina N, Shadrova N, Ibragimova A. Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. Vet World. 2020;13(1):197-200.
7. Williams MM, Armbruster CR, Arduino MJ. Plumbing of hospital premises is a reservoir for opportunistically pathogenic microorganisms: a review. Biofouling. 2013;29(2):147-62.
8. López-Cerero L. Papel del ambiente hospitalario y los equipamientos en la transmisión de las infecciones nosocomiales. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014;32(7):459-64.
9. Bagley ST. Habitat association of *Klebsiella* species. Infect Control. 1985;6(2):52-8.
10. Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. Appl Microbiol. 1975;30(3):381-5.
11. Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP. Changing Pharyngeal Bacterial Flora of Hospitalized Patients. N Engl J Med. 1969;281(21):1137-40.
12. Selden R, Lee S, Wang WL, Bennett JV, Eickhoff TC. Nosocomial *Klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. Ann Intern Med. 1971;74(5):657-64.
13. Pollack M, Charache P, Nieman RE, Jett MP, Reimhardt JA, Hardy PH. Factors influencing colonisation and antibiotic-resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. Lancet. 1972;2(7779):668-71.
14. PROTOCOLO DE VIGILANCIA Y CONTROL DE INFECCIONES RELACIONADAS CON LA ASISTENCIA SANITARIA (IRAS). Junta de Andalucía. [Internet] [citado 7 de febrero de 2022]. ALGUNOS ASPECTOS ESPECIFICOS POR MICROORGANISMO MULTIRRESISTENTE; [aprox. 9 p.]. Disponible en: https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/salud_5af95879ccd87_IRASMMR.pdf

15. RP Wenzel. Prevention and Control of Nosocomial Infections. 2nd ed. Baltimore, editor. Williams & Wilkins; 1993.
16. Stamm WE, Weinstein RA, Dixon RE. Comparison of endemic and epidemic nosocomial infections. Am J Med. 1981;70(2):393-7.
17. Little ML, Qin X, Zerr DM, Weissman SJ. Molecular epidemiology of colonizing and disease-causing *Klebsiella pneumoniae* in paediatric patients. J Med Microbiol. 2014;63(4):610-6.
18. Lee MK, Kim S-H, Yong SJ, Shin KC, Park HC, Choi J, *et al.* Clinical and microbiological features of patients admitted to the intensive care unit with nursing and healthcare-associated pneumonia. J Int Med Res. 2015;43(2):236-49.
19. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016;80(3):629-61.
20. VFDB - pathogenesis of *Klebsiella* [Internet]. [citado 7 de febrero de 2022]. About *Klebsiella*; [aprox 1 p.]. Disponible en: <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Klebsiella>
21. Hansen DS, Mestre F, Albertí S, Hernández-Allés S, Álvarez D, Doménech-Sánchez A, *et al.* *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysaccharide O Typing: Revision of Prototype Strains and O-Group Distribution among Clinical Isolates from Different Sources and Countries. J Clin Microbiol. 1999;37(1):56-62.
22. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589-603.
23. Rendueles O. Deciphering the role of the capsule of *Klebsiella pneumoniae* during pathogenesis: A cautionary tale. Mol. Microbiol. 2020;113(5):883-8.
24. Dorman MJ, Feltwell T, Goulding DA, Parkhill J, Short FL, Chang YF. The Capsule Regulatory Network of *Klebsiella pneumoniae* Defined by density-TraDISort. mBio. 2018;9(6):e01863-18.
25. Hagiya H, Watanabe N, Maki M, Murase T, Otsuka F. Clinical utility of string test as a screening method for hypermucoviscosity-phenotype *Klebsiella pneumoniae*. Acute Med Surg. 2014;1(4):245-6.
26. Llobet E, Martínez-Moliner V, Moranta D, Dahlström KM, Regueiro V, Tomás A, *et al.* Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(46):E6369-6378.
27. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. Future Microbiol. 2014;9(9):1071-81.
28. Vinogradov E, Fridrich E, MacLean LL, Perry MB, Petersen BO, Duus JØ, *et al.* Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*. Elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains. J Biol Chem. 2002;277(28):25070-81.

29. March C, Cano V, Moranta D, Llobet E, Pérez-Gutiérrez C, Tomás JM, *et al.* Role of Bacterial Surface Structures on the Interaction of *Klebsiella pneumoniae* with Phagocytes. PLoS One. 2013;8(2):e56847.
30. Lawlor MS, O'Connor C, Miller VL. Yersiniabactin Is a Virulence Factor for *Klebsiella pneumoniae* during Pulmonary Infection. Infect Immun. 2007;75(3):1463-72.
31. Compain F, Babosan A, Brisse S, Genel N, Audo J, Ailloud F, *et al.* Multiplex PCR for Detection of Seven Virulence Factors and K1/K2 Capsular Serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2014;52(12):4377-80.
32. Allen BL, Gerlach GF, Clegg S. Nucleotide sequence and functions of *mrk* determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. J Bacteriol. 1991;173(2):916-20.
33. Felson B, Rosenberg LS, Hamburger M Jr. Roentgen Findings in Acute Friedländer's Pneumonia. Radiology. 1949;53(4):559-65.
34. Friedländer C. Über die scizomyceten bei der acuten fibrosen pneumonie. Arch Pathol Anat Physiol Klin Med. 1882;87:319–24.
35. Bergogne-Bérézin E. [Nosocomial infections: new agents, incidence, prevention]. Presse Med. 1995;24(2):89-97.
36. Bouza E, Cercenado E. *Klebsiella* and *Enterobacter*: antibiotic resistance and treatment implications. Semin Respir Infect. 2002;17(3):215-30.
37. Gonzalez-Ferrer S, Peñaloza HF, Budnick JA, Bain WG, Nordstrom HR, Lee JS, *et al.* Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. Infect Immun. 2021;89(4):e00693-20.
38. Estudio EPINE-EPPS nº30:2019. Prevalencia de infecciones (relacionadas con la asistencia sanitaria y comunitarias) y uso de antimicrobianos en hospitales de agudos. Versión 1.0. Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. [Internet]. [citado 7 de febrero de 2022]. Estudio EPINE; [aprox. 91 p.]. Disponible en: <https://epine.es/api/documento-publico/2019%20EPINE%20Informe%20Espa%C3%B1a%2027112019.pdf/reports-esp>
39. Jones RN. Microbial Etiologies of Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. Clin Infect Dis. 2010;51(Supplement_1):S81-7.
40. Korvick JA, Hackett AK, Yu VL, Muder RR. *Klebsiella pneumoniae* in the modern era: clinicroadiographic correlations. South Med J. 1991;84(2):200-4.
41. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2005;171(4):388-416.

42. Ko W-C, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S, *et al.* Community-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Global Differences in Clinical Patterns. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(2):160-6.
43. Marik PE. The clinical features of severe community-acquired pneumonia presenting as septic shock. Norasept II Study Investigators. *J Crit Care.* 2000;15(3):85-90.
44. Moon WK, Im JG, Yeon KM, Han MC. Complications of *Klebsiella pneumoniae*: CT evaluation. *J Comput Assist Tomogr.* 1995;19(2):176-81.
45. Jong GM, Hsiue TR, Chen CR, Chang HY, Chen CW. Rapidly fatal outcome of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in alcoholics. *Chest.* 1995;107(1):214-7.
46. Rahimian J, Wilson T, Oram V, Holzman RS. Pyogenic liver abscess: recent trends in etiology and mortality. *Clin Infect Dis.* 2004;39(11):1654-9.
47. Sobirk SK, Struve C, Jacobsson SG. Primary *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess with Metastatic Spread to Lung and Eye, a North-European Case Report of an Emerging Syndrome. *Open Microbiol J.* 2010;4:5-7.
48. Li J, Fu Y, Wang J-Y, Tu C-T, Shen X-Z, Li L, *et al.* Early diagnosis and therapeutic choice of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess. *Front Med China.* 2010;4(3):308-16.
49. Zhang S, Zhang X, Wu Q, Zheng X, Dong G, Fang R, *et al.* Clinical, microbiological, and molecular epidemiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae*-induced pyogenic liver abscess in southeastern China. *Antimicrob. Resist. & Infect. Control.* 2019;8(1).
50. Basu S. *Klebsiella pneumoniae*: An Emerging Pathogen of Pyogenic Liver Abscess. *Oman Med J.* 2009;24(2):131-3.
51. Kamal F, Williams G, Akbar H, Khan MA, Kadaria D. *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess: a Case Report and Review of Literature. *Cureus.* 2017;9(1):e970.
52. Lee NK, Kim S, Lee JW, Jeong YJ, Lee SH, Heo J, *et al.* CT differentiation of pyogenic liver abscesses caused by *Klebsiella pneumoniae* vs non-*Klebsiella pneumoniae*. *Br J Radiol.* 2011;84(1002):518-25.
53. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015;13(5):269-84.
54. García de la Torre M, Romero-Vivas J, Martínez-Beltrán J, Guerrero A, Meseguer M, Bouza E. *Klebsiella* bacteremia: an analysis of 100 episodes. *Rev Infect Dis.* 1985;7(2):143-50.
55. Hansen DS, Gottschau A, Kolmos HJ. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. *J Hosp Infect.* 1998;38(2):119-32.

56. Kang C-I, Kim S-H, Bang J-W, Kim H-B, Kim N-J, Kim E-C, *et al.* Community-acquired versus nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance. *J Korean Med Sci.* 2006;21(5):816-22.
57. Fang C-T, Lai S-Y, Yi W-C, Hsueh P-R, Liu K-L, Chang S-C. *Klebsiella pneumoniae* Genotype K1: An Emerging Pathogen That Causes Septic Ocular or Central Nervous System Complications from Pyogenic Liver Abscess. *Clin Infect Dis.* 2007;45(3):284-93.
58. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio.* 2008;12(3):227-32.
59. Hernández-Allés S, Albertí S, Álvarez D, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Gil J, *et al.* Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology.* 1999;145(3):673-9.
60. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2009;27(2):116-29.
61. Gómez J, García-Vázquez E, Hernández-Torres A. Los betalactámicos en la práctica clínica. Revisión. Vol. 28, *Rev Esp Quimioter.* 2015.
62. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289(1036):321-31.
63. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211-33.
64. Jaurin B, Grundström T. ampC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(8):4897-901.
65. Tolmasky ME. Sequencing and expression of aadA, bla, and tnpR from the multiresistance transposon Tn1331. *Plasmid.* 1990;24(3):218-26.
66. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-58, table of contents.
67. Oliver A, Cantón R. Enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido [Internet]. [cited 2020 Oct 13]. Control Calidad SEIMC; [aprox. 10 p.]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Blees.pdf>
68. Petrosino JF, Pendleton AR, Weiner JH, Rosenberg SM. Chromosomal system for studying AmpC-mediated β -lactam resistance mutation in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(5):1535-9.
69. Bush K, Macalintal C, Rasmussen BA, Lee VJ, Yang Y. Kinetic interactions of tazobactam with β -lactamases from all major structural classes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(4):851-8.

70. Kazmierczak A, Cordin X, Duez JM, Siebor E, Pechinot A, Sirot J. Differences between clavulanic acid and sulbactam in induction and inhibition of cephalosporinases in Enterobacteria. *J Int Med Res.* 1990;18 Suppl 4:67D-77D.
71. Pai H, Kang C-I, Byeon J-H, Lee K-D, Park WB, Kim H-B, et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(10):3720-8.
72. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):2153-62.
73. Navarro F, Miró E, Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28(9):638-45.
74. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33(3):259-63.
75. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(17):6278.
76. Hidalgo L, Hopkins K, Gutierrez B, Ovejero C, Suruchi S, Douthwaite S, et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant *RmtF* with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. *J. Antimicrob Chemother.* 2013 Aug;68.
77. Hooper DC. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. *Clin Infect Dis.* 1998;27 Suppl 1:S54-63.
78. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):252-275.
79. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161-8.
80. Källman O, Motakefi A, Wretling B, Kalin M, Olsson-Liljequist B, Giske CG. Cefuroxime non-susceptibility in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* overexpressing *ramA* and *acrA* and expressing *ompK35* at reduced levels. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(5):986-90.
81. Takahata S, Ida T, Hiraishi T, Sakakibara S, Maebashi K, Terada S, et al. Molecular mechanisms of fosfomicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):333-7.
82. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomicin. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(2):321-47.
83. Huovinen P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis.* 2001;32(11):1608-14.

84. Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(2):279-89.
85. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol.* 2011;301(8):654-8.
86. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(6-7):298-304.
87. Beceiro A, Tomás M, Bou G. Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(8):492-9.
88. Mathers AJ, Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, Giess A, Yeh AJ, *et al.* *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* at a single institution: insights into endemicity from whole-genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(3):1656-63.
89. Livermore DM, on behalf of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy Working Party on The Urgent Need: Regenerating Antibacterial Drug Discovery and Development, Blaser M, Carrs O, Cassell G, Fishman N, *et al.* Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(9):1941-4.
90. Ramirez MS, Xie G, Johnson S, Davenport K, van Duijn D, Perez F, *et al.* Genome Sequences of Two Carbapenemase-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 Isolates. *Genome Announc.* 2014;2(3):e00558-14.
91. Kachroo AH, Jayaram M, Rowley PA. Metabolic engineering without plasmids. *Nat Biotechnol.* 2009;27(8):729-31.
92. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(1):185-91.
93. Sabaté M, Prats G. [Structure and function of integrons]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2002;20(7):341-5.
94. Falagas ME, Grammatikos AP, Michalopoulos A. Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2008;6(5):593-600.
95. Petrosillo N, Giannella M, Lewis R, Viale P. Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(2):159-77.
96. Moellering RC. Cefamandole: A New Member of the Cephalosporin Family. *J Infect Dis.* 1978;137:S2-9.
97. O'Callaghan CH, Sykes RB, Griffiths A, Thornton JE. Cefuroxime, a new cephalosporin antibiotic: activity in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 1976;9(3):511-9.
98. Garzone P, Lyon J, Yu VL. Third-Generation and Investigational Cephalosporins: I. Structure-Activity Relationships and Pharmacokinetic Review. *Drug Intell.* 1983;17(7-8):507-15.

99. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983;11(6):315-7.
100. Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(5):755-8.
101. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(1):147-51.
102. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla*IMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(4):824-9.
103. 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*. 2001;45(4):1151-61.
104. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(4):228-36.
105. Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece - a review of the current evidence. *Euro Surveill*. 2008;13(4):7-8.
106. Kassis-Chikhani N, Decré D, Gautier V, Burghoffer B, Saliba F, Mathieu D, *et al*. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*VIM-1 and *bla*SHV-5 in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(1):142-5.
107. Tato M, Coque TM, Ruíz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, *et al*. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis*. 2007;45(9):1171-8.
108. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, *et al*. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill*. 2010;15(46):19711.
109. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, *et al*. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5046-54.
110. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2950.
111. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1791-8.

112. Oteo J, Calbo E, Rodríguez-Baño J, Oliver A, Hornero A, Ruiz-Garbajosa P, *et al.* [The threat of the carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain: positioning report of the SEIMC study groups, GEIH and GEMARA]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(10):666-70.
113. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Internet]. [citado 29 de junio de 2022]. ECDC; [aprox. 1p.]. Disponible en: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx?Dataset=27&HealthTopic=4>
114. Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA. The Use of Molecular Techniques in the Epidemiology and Control of Infectious Diseases. *Clin Lab Med.* 1995;15(2):407-31.
115. Coll P, Coque MT, Domínguez MA, Vázquez J, Vila J. Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2005 [citado 22 de febrero de 2022]. *Procedimientos en Microbiología Clínica*; [aprox. 68 p.]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia18.pdf>
116. Sboner A, Mu XJ, Greenbaum D, Auerbach RK, Gerstein MB. The real cost of sequencing: higher than you think! *Genome Biol.* 2011;12(8):125.
117. Nasonova E. Pulsed field gel electrophoresis: Theory, instruments and application. *Cell and Tissue Biol.* 2008;2:557-65.
118. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233-9.
119. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4178-82.
120. Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TEA, Crook DW. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nat Rev Genet.* 2012;13(9):601-12.
121. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, *et al.* Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* 1995;269(5223):496-512.
122. Kchouk M, Gibrat JF, Elloumi M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biol Med.* 2017;09(03).
123. Shendure J, Balasubramanian S, Church GM, Gilbert W, Rogers J, Schloss JA, *et al.* DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature.* 2017;550(7676):345-53.
124. Church DL, Cerutti L, Gürtler A, Griener T, Zelazny A, Emler S. Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(4):e00053-19.

125. Escalona M, Rocha S, Posada D. A comparison of tools for the simulation of genomic next-generation sequencing data. *Nat Rev Genet.* 2016;17(8):459-69.
126. Motro Y, Moran-Gilad J. Next-generation sequencing applications in clinical bacteriology. *Biomol Detect Quantif.* 2017;14:1-6.
127. Mushtaq A. Updates in tuberculosis diagnosis in the USA. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(2):147-8.
128. Jauk F. Secuenciación masiva paralela (NGS): conceptos básicos y aplicaciones. *Hematología Volumen 23 Numero Extraordinario XXIV Congreso Argentino de Hematología: 21-38 Octubre 2019.* [citado 22 de febrero de 2022]. Disponible en: http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol23/n2_educacional/2-ROL%20DE%20NGS%20EN%20PATOLOGIA%20MIELOIDE-jauk-n23-ext.pdf
129. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data [Internet]. [citado 22 de febrero de 2022]. Babraham Institute; [aprox. 7 p.]. Disponible en: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
130. PRINSEQ @ SourceForge.net [Internet]. [citado 22 de febrero de 2022]. PRINSEQ; [aprox. 7 p.]. Disponible en: <http://prinseq.sourceforge.net/>
131. USADELLAB.org - Trimmomatic: A flexible read trimming tool for Illumina NGS data [Internet]. [citado 22 de febrero de 2022]. USADELLAB.org; [aprox. 7 p.]. Disponible en: <http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic>
132. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-9.
133. bcftools [Internet]. [citado 22 de febrero de 2022]. bcftools(1) Manual Page; [aprox. 40 p.]. Disponible en: <https://samtools.github.io/bcftools/bcftools.html>
134. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, *et al.* SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455-77.
135. Richardson EJ, Watson M. The automatic annotation of bacterial genomes. *Brief Bioinform.* 2013;14(1):1-12.
136. Boolchandani M, D'Souza AW, Dantas G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nat Rev Genet.* 2019;20(6):356-70.
137. Kleinheinz KA, Joensen KG, Larsen MV. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. *Bacteriophage.* 2014;4:e27943.
138. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, Couto N, Ferdous M, García-Cobos S, *et al.* Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J Biotechnol.* 2017;243:16-24.

139. Neoh H-M, Tan X-E, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the «gold standard» for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol.* 2019;74:103935.
140. World Health Organization. Whole genome sequencing for foodborne disease surveillance: landscape paper [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2018 [citado 22 de febrero de 2022]. World Health Organization; [aprox. 1 p.]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272430>
141. Lecuit M, Eloit M. The diagnosis of infectious diseases by whole genome next generation sequencing: a new era is opening. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:25.
142. Arena F, Rolfe PA, Doran G, Conte V, Gruszka S, Clarke T, *et al.* Rapid Resistome Fingerprinting and Clonal Lineage Profiling of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates by Targeted Next-Generation Sequencing. *J Clin Microbiol.* 2014;52(3):987-90.
143. Mega [Internet]. [citado 22 de febrero de 2022]. Molecular Evolutionary Genetic Analysis; [aprox. 1 p.]. Disponible en: <https://www.megasoftware.net/>
144. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, *et al.* IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Teeling E, editor. *Mol Biol and Evol.* 2020;37(5):1530-4.
145. FigTree [Internet]. [citado 22 de febrero de 2022]. Molecular Evolution, phylogenetics and epidemiology; [aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
146. Cantón R, Morosini MI. Microorganismos multirresistentes en los hospitales: un riesgo amenazante. *Gastroenterología y Hepatología Continuada.* 2010;9(5):254-7.
147. López-Pueyo MJ, Barcenilla-Gaite F, Amaya-Villar R, Garnacho-Montero J. Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Med Intensiva.* 2011;35(1):41-53.
148. Ontanilla G, Herrera JM, Alcívar JM, Martín-Gutiérrez G, Márquez C, Márquez JL. Liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* and its relation to colon lesions. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015;107(1):51-2.
149. Peña C, Pujol M, Ardanuy C, Ricart A, Pallares R, Liñares J, *et al.* Epidemiology and successful control of a large outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(1):53-8.
150. Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First Outbreak of a Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing OXA-48 β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4398-401.
151. Yu VL, Hansen DS, Ko WC, Sagnimeni A, Klugman KP, von Gottberg A, *et al.* Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(7):986-93.

152. Wu HS, Wang F der, Tseng CP, Wu TH, Lin YT, Fung CP. Characteristics of healthcare-associated and community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in Taiwan. *J Infect.* 2012;64(2):162–8.
153. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, Bou G, Conejo C, Fernández-Martínez M, *et al.* Prospective multicenter study of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3406-12.
154. Christensen SC, Korner B. An endemic caused by multiresistant *Klebsiella* in an urological unit. *Scand J Urol Nephrol.* 1972;6(3):232-8.
155. Noriega ER, Leibowitz RE, Richmond AS, Rubinstein E, Schaeffer S, *et al.* Nosocomial Infection Caused by Gentamicin-Resistant, Streptomycin-Sensitive *Klebsiella*. *J Infect Dis.* 1975;131 Suppl:S45-50.
156. Bauernfeind A, Eberlein E, Holley M, Schweighart S, Rosenthal E. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients. *Infection.* 1993;21(1):18-22.
157. Medeiros AA. Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria: extended-spectrum beta-lactamases have arrived in North America. *Ann Intern Med.* 1993;119(5):428-30.
158. Paterson DL, Ko W-C, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, *et al.* International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial Infections. *Ann Intern Med.* 2004;140(1):26-32.
159. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):306-25.
160. Baquero F, Coque TM. Multilevel population genetics in antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):705-6.
161. David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, *et al.* Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol.* 2019;4(11):1919-29.
162. Vázquez JA, Berrón S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004;22(2):113–20.
163. Karaiskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G. The “Old” and the “New” Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. *Front. Public Health.* 2019;7.
164. Sikora A, Zahra F. Nosocomial Infections. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citado 2 de marzo de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559312/>

165. Community acquired Infections | Disease Outbreak Control Division [Internet]. [citado 2 de marzo de 2022]. Disease Outbreak Control Division; [aprox. 1 p.]. Disponible en: <https://health.hawaii.gov/docd/disease-types/community-infections/>
166. Schoonjans F. MedCalc statistical software [Internet]. MedCalc. [citado 1 de octubre de 2019]. User-friendly statistical software; [aprox. 1 p.]. Disponible en: <https://www.medcalc.org/>
167. Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines [Internet]. Clinical & Laboratory Standards Institute. [citado 2 de marzo de 2022]. Global Laboratory Standards for a Healthier World; [aprox. 1 p.]. Disponible en: <https://clsi.org/>
168. EUCAST: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics [Internet]. [citado 11 de octubre de 2019]. European Committee on antimicrobial susceptibility testing; [aprox. 1 p.]. Disponible en: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
169. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81.
170. Calvo J, Cantón R, Fernández Cuenca F, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2011. [citado 20 de abril de 2022]. *Procedimientos en Microbiología Clínica*; [aprox. 54 p.]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
171. Vila A, Cassata A, Pagella H, Amadio C, Yeh KM, Chang FY, *et al.* Appearance of *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess Syndrome in Argentina: Case Report and Review of Molecular Mechanisms of Pathogenesis. *Open Microbiol J.* 2011;5:107-13.
172. Han H, Zhou H, Li H, Gao Y, Lu Z, Hu K, *et al.* Optimization of Pulse-Field Gel Electrophoresis for Subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(7):2720-31.
173. BioNumerics version 7.6 released [Internet]. 2016 [citado 27 de abril de 2022]. Biomérieux; [aprox. 1 p.]. Disponible en: <https://www.applied-maths.com/news/bionumerics-version-76-released>
174. Møller TSB, Liu G, Boysen A, Thomsen LE, Lüthje FL, Mortensen S, *et al.* Treatment with Cefotaxime Affects Expression of Conjugation Associated Proteins and Conjugation Transfer Frequency of an IncI1 Plasmid in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 2017;8.
175. Matsumura Y, Peirano G, Pitout JDD. Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* J53, an Azide-Resistant Laboratory Strain Used for Conjugation Experiments. *Genome Announc.* 24 de mayo de 2018;6(21):e00433-18.

176. Illumina. Quality Scores for Next-Generation Sequencing [Internet]. 2011 [citado 14 de Octubre 2020]. Assessing sequencing accuracy using Phred quality scoring; [aprox. 2 p.]. Disponible en: https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf
177. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Källér M. MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016;32(19):3047–8.
178. *Klebsiella pneumoniae* - MLST [Internet]. [citado 14 de Octubre 2020]. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity; [aprox. 1 p.]. Disponible en: https://pubmlst.org/bigsub?db=pubmlst_mlst_seqdef&page=schemeInfo&scheme_id=13
179. Hunt M, Mather AE, Sánchez-Busó L, Page AJ, Parkhill J, Keane JA, *et al.* ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microb Genom*. octubre de 2017;3(10):e000131.
180. CD-HIT Official Website [Internet]. [citado 14 de Octubre 2020]. Representative sequences; [aprox. 1 p.]. Disponible en: <http://weizhongli-lab.org/cd-hit/>
181. GitHub - lh3/fermi-lite: Standalone C library for assembling Illumina short reads in small regions [Internet]. [citado 14 de Octubre 2020]. lh3/fermi-lite; [aprox. 4 p.]. Disponible en: <https://github.com/lh3/fermi-lite>
182. The MUMmer 3 manual [Internet]. [citado 14 de Octubre 2020]. MUMMER 3+ MANUAL; [aprox. 20 p.]. Disponible en: <http://mummer.sourceforge.net/manual/>
183. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9(4):357-9.
184. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, *et al.* ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):212-20.
185. McArthur AG, Waglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, *et al.* The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(7):3348-57.
186. Lakin SM, Dean C, Noyes NR, Dettenwanger A, Ross AS, Doster E, *et al.* MEGARes: an antimicrobial resistance database for high throughput sequencing. *Nucleic Acids Res*. 2017;45(Database issue):D574-80.
187. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, *et al.* ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*. 2020;75(12):3491-500.
188. Doster E, Lakin SM, Dean CJ, Wolfe C, Young JG, Boucher C, *et al.* MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D561-9.
189. Chen L, Yang J, Yu J, Yao Z, Sun L, Shen Y, *et al.* VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Database issue):D325-328.

190. National Center for Biotechnology Information [Internet]. [citado 27 de abril de 2022]. National Library of Medicine; [aprox. 1 p.] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
191. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068-9.
192. RefSeq: NCBI Reference Sequence Database [Internet]. [citado 10 noviembre 2020]. National Library of Medicine; [aprox. 1 p.]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>
193. Abuín JM, Pichel JC, Pena TF, Amigo J. BigBWA: approaching the Burrows–Wheeler aligner to Big Data technologies. *Bioinformatics*. 2015;31(24):4003-5.
194. samtools manual page [Internet]. [citado 16 noviembre 2020]. samtools; [aprox. 10 p.]. Disponible en: <http://www.htslib.org/doc/samtools.html>
195. GitHub - lh3/seqtk: Toolkit for processing sequences in FASTA/Q formats [Internet]. [citado 16 noviembre 2020]. lh3/seqtk; [aprox. 2 p.]. Disponible en: <https://github.com/lh3/seqtk>
196. SPAdes – Center for Algorithmic Biotechnology [Internet]. [citado 14 octubre 2020]. SPAdes; [aprox. 1 p.]. Available from: <https://cab.spbu.ru/software/spades/>
197. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072–5.
198. Lechner M, Findeiß S, Steiner L, Marz M, Stadler PF, Prohaska SJ. Proteinortho: Detection of (Co-)orthologs in large-scale analysis. *BMC Bioinform*. 2011;12(1):124.
199. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772-80.
200. Capella-Gutiérrez S, Silla-Martínez JM, Gabaldón T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*. 2009;25(15):1972-3.
201. Borowiec ML. AMAS: a fast tool for alignment manipulation and computing of summary statistics. *PeerJ*. 2016;4:e1660.
202. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 2015;32(1):268-74.
203. Letunic I, Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(W1):W293-6.
204. Kim D-W, Cha C-J. Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Exp Mol Med*. 2021;53(3):301-9.

205. Foulongne V, Michaux-Charachon S, Jumas-Bilak E, O'Callaghan D, Ramuz M. [Strategies for bacterial virulence genes identification]. *Pathol Biol.* 2004;52(2):104-14.
206. Siefert J. Defining the Mobilome. *Methods mol biol.* 2009;532:13-27.
207. Bodro M, Sabé N, Tubau F, Lladó L, Baliellas C, Roca J, *et al.* Risk factors and outcomes of bacteremia caused by drug-resistant ESKAPE pathogens in solid-organ transplant recipients. *Transplantation.* 2013;96(9):843-9.
208. Hoenigl M, Valentin T, Zarfel G, Wuerstl B, Leitner E, Salzer HJF, *et al.* Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella oxytoca* in Austria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(4):2158-61.
209. Van 't Veen A, van der Zee A, Nelson J, Speelberg B, Kluytmans JAJW, Buiting AGM. Outbreak of infection with a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain associated with contaminated roll boards in operating rooms. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):4961-7.
210. Pereira GH, Garcia DO, Mostardeiro M, Fanti KS, Levin AS. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: two-year epidemiologic follow-up in a tertiary hospital. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(1):113-5.
211. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. [citado 2 de mayo de 2022]. World Health Organization; [aprox. 3 p.]. Disponible en: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
212. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, *et al.* Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(1):56-66.
213. Carlet J, Jarlier V, Harbarth S, Voss A, Goossens H, Pittet D, *et al.* Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. *Antimicrob Resist and Infect Control.* 2012;1(1):11.
214. Giske CG, Monnet DL, Cars O, Carmeli Y, ReAct-Action on Antibiotic Resistance. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(3):813-21.
215. Broberg CA, Palacios M, Miller VL. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Rep.* 2014;6:64.
216. Pien BC, Sundaram P, Raoof N, Costa SF, Mirrett S, Woods CW, *et al.* The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults. *Am J Med.* 2010;123(9):819-28.
217. Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S, *et al.* Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(2):160-6.

218. Ashurst JV, Dawson A. *Klebsiella pneumoniae*. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citado 2 de mayo de 2022]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/>
219. Codjoe FS, Donkor ES. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci*. 2017;6(1):1.
220. Saldarriaga Quintero E, Echeverri-Toro L, Ospina Ospina S. Factores clínicos asociados a multirresistencia bacteriana en un hospital de cuarto nivel. *Infectio*. diciembre de 2015;19(4):161-7.
221. Chaouch C, Hassairi A, Riba M, Boujaafar N. [Association between bacterial resistance and antimicrobial consumption]. *Ann Biol Clin*. 2014;72(5):555-60.
222. Baker S, Thomson N, Weill FX, Holt KE. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. *Science*. 2018;360(6390):733-8.
223. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-76.
224. Fuster B, Tormo N, García C, Gimeno C. Detection of two simultaneous outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* co-producing OXA-48 and NDM-1 carbapenemases in a tertiary hospital in Valencia, Spain. *New Microbes New Infect*. 2020;34:100660.
225. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo- β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(1):103-6.
226. European Centre for Disease Prevention and Control., World Health Organization. Antimicrobial resistance surveillance in Europe: 2022 : 2020 data. [Internet]. LU: Publications Office; 2022 [citado 23 de junio de 2022]. Antimicrobial resistance surveillance in Europe; [aprox. 2 p.]. Disponible en: <https://data.europa.eu/doi/10.2900/112339>
227. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol*. 2014;22(8):438-45.
228. Nam YS, Cho SY, Yang HY, Park KS, Jang JH, Kim YT, et al. Investigation of mutation distribution in DNA gyrase and topoisomerase IV genes in ciprofloxacin-non-susceptible *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures in a tertiary care university hospital in South Korea, 2005-2010. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(2):126-9.
229. Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, Albertí S, Tomás JM, Benedi VJ, Jacoby GA. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(2):342-8.
230. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiol Spectr*. 2014;2(5).

231. Mirzaii M, Jamshidi S, Zamanzadeh M, Marashifard M, Malek Hosseini SAA, Haeili M, *et al.* Determination of *gyrA* and *parC* mutations and prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with urinary tract infection in Iran. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018;13:197-200.
232. Ruiz E, Sáenz Y, Zarazaga M, Rocha-Gracia R, Martínez-Martínez L, Arlet G, *et al.* *qnr*, *aac(6′)-Ib-cr* and *qepA* genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.*: genetic environments and plasmid and chromosomal location. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(4):886-97.
233. Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat.* 2016;29:13-29.
234. Saiful Anuar A.S., Mohd Yusof M.Y., Tay S.T. Prevalence of plasmid-mediated *qnr* determinants and gyrase alteration in *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university teaching hospital in Malaysia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(13):1744-47.
235. Doi Y, Wachino JI, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(2):523-37.
236. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(6):a027029.
237. Poirel L, Goutines J, Aires-de-Sousa M, Nordmann P. High Rate of Association of 16S rRNA Methylases and Carbapenemases in *Enterobacteriaceae* Recovered from Hospitalized Children in Angola. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. abril de 2018 [citado 2 de mayo de 2022];62(4). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5913928/>
238. El-Badawy MF, Tawakol WM, El-Far SW, Maghrabi IA, Al-Ghamdi SA, Mansy MS, *et al.* Molecular Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Recovered from Egyptian Patients. *Int J Microbiol.* 2017;2017:8050432.
239. Brolund A, Sundqvist M, Kahlmeter G, Grape M. Molecular characterisation of trimethoprim resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a two year intervention on trimethoprim use. *PLoS One.* 2010;5(2):e9233.
240. Shin HW, Lim J, Kim S, Kim J, Kwon GC, Koo SH. Characterization of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance genes and their relatedness to class 1 integron and insertion sequence common region in gram-negative bacilli. *J Microbiol Biotechnol.* 2015;25(1):137-42.
241. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, *et al.* Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(4):786-90.
242. Arcilla MS, van Hattem JM, Matamoros S, Melles DC, Penders J, de Jong MD, *et al.* Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):147-9.

243. Hu Y, Liu F, Lin IYC, Gao GF, Zhu B. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):146-7.
244. Kai J, Wang S. Recent progress on elucidating the molecular mechanism of plasmid-mediated colistin resistance and drug design. *Int Microbiol*. 2020;23(3):355-66.
245. Cheng YH, Lin TL, Pan YJ, Wang YP, Lin YT, Wang JT. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(5):2909-13.
246. Livermore DM. Tigecycline: what is it, and where should it be used? *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(4):611-4.
247. Golan Y. Empiric therapy for hospital-acquired, Gram-negative complicated intra-abdominal infection and complicated urinary tract infections: a systematic literature review of current and emerging treatment options. *BMC Infect Dis*. 2015;15:313.
248. Osei Sekyere J, Govinden U, Bester LA, Essack SY. Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods. *J Appl Microbiol*. 2016;121(3):601-17.
249. Grossman TH. Tetracycline Antibiotics and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(4):a025387.
250. Kurabayashi K, Tanimoto K, Fueki S, Tomita H, Hirakawa H. Elevated Expression of GlpT and UhpT via FNR Activation Contributes to Increased Fosfomycin Susceptibility in *Escherichia coli* under Anaerobic Conditions. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):6352-60.
251. Falagas ME, Athanasaki F, Voulgaris GL, Triarides NA, Vardakas KZ. Resistance to fosfomycin: Mechanisms, Frequency and Clinical Consequences. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;53(1):22-8.
252. Wang YP, Chen YH, Hung IC, Chu PH, Chang YH, Lin YT, et al. Transporter Genes and *fosA* Associated With Fosfomycin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol* [Internet]. 2022 [citado 26 de junio de 2022];13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8841775/>
253. Khalid A, Lubián AF, Ma L, Lin RCY, Iredell JR. Characterizing the role of porin mutations in susceptibility of beta lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates to ceftaroline and ceftaroline-avibactam. *International Journal of Infectious Diseases*. 2020;93:252-7.
254. Schulz GE. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1565(2):308-17.
255. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(4):659-67.

256. Kopotsa K, Mbelle NM, Osei Sekyere J 2020. Epigenomics, genomics, resistome, mobilome, virulome and evolutionary phylogenomics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. *Microb Genome*. 2020;6(12):mgen000474.
257. Mbelle NM, Feldman C, Sekyere JO, Maningi NE, Modipane L, Essack SY. Pathogenomics and Evolutionary Epidemiology of Multi-Drug Resistant Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Pretoria, South Africa. *Sci Rep*. 2020;10(1):1232.
258. Pedersen T, Sekyere JO, Govinden U, Moodley K, Sivertsen A, Samuelsen Ø, *et al*. Spread of Plasmid-Encoded NDM-1 and GES-5 Carbapenemases among Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Clinical *Enterobacteriaceae* in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(5):e02178-17.
259. Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, Canton R, Doumith M, Giske C, *et al*. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(1):2-22.
260. Sheppard AE, Stoesser N, Sebra R, Kasarskis A, Deikus G, Anson L, *et al*. Complete Genome Sequence of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain CAV1193. *Genome Announc*. 2016;4(1):e01649-15.
261. Huang XZ, Frye JG, Chahine MA, Glenn LM, Ake JA, Su W, *et al*. Characteristics of Plasmids in Multi-Drug-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated during Prospective Surveillance of a Newly Opened Hospital in Iraq. *PLOS ONE*. 2012;7(7):e40360.
262. Botts RT, Apffel BA, Walters CJ, Davidson KE, Echols RS, Geiger MR, *et al*. Characterization of Four Multidrug Resistance Plasmids Captured from the Sediments of an Urban Coastal Wetland. *Front Microbiol* [Internet]. 2017 [citado 2 de mayo de 2022];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01922>
263. Liu BT, Zhang XY, Wan SW, Hao JJ, Jiang RD, Song FJ. Characteristics of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in Ready-to-Eat Vegetables in China. *Front Microbiol* [Internet]. 2018 [citado 2 de mayo de 2022];9. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01147>
264. Sugawara Y, Akeda Y, Sakamoto N, Takeuchi D, Motooka D, Nakamura S, *et al*. Genetic characterization of *bla*NDM-harboring plasmids in carbapenem-resistant *Escherichia coli* from Myanmar. *PLOS ONE*. 2017;12(9):e0184720.
265. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Derepressed Transfer Properties Leading to the Efficient Spread of the Plasmid Encoding Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(1):467.
266. Dong D, Li M, Liu Z, Feng J, Jia N, Zhao H, *et al*. Characterization of a NDM-1- Encoding Plasmid pHFK418-NDM From a Clinical *Proteus mirabilis* Isolate Harboring Two Novel Transposons, Tn6624 and Tn6625. *Front Microbiol* [Internet]. 2019 [citado 2 de mayo de 2022];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02030>

267. Gama JA, Kloos J, Johnsen PJ, Samuelsen Ø. Host dependent maintenance of a blaNDM-1-encoding plasmid in clinical *Escherichia coli* isolates. *Sci Rep*. 2020;10(1):9332.
268. Alonso-del Valle A, León-Sampedro R, Rodríguez-Beltrán J, DelaFuente J, Hernández-García M, Ruiz-Garbajosa P, *et al*. Variability of plasmid fitness effects contributes to plasmid persistence in bacterial communities. *Nat Commun*. 2021;12(1):2653.
269. Chen CJ, Wu TL, Lu PL, Chen YT, Fung CP, Chuang YC, *et al*. Closely Related NDM-1-Encoding Plasmids from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLOS ONE*. 2014;9(8):e104899.
270. Ferreira RL, da Silva BCM, Rezende GS, Nakamura-Silva R, Pitondo-Silva A, Campanini EB, *et al*. High Prevalence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Harboring Several Virulence and β -Lactamase Encoding Genes in a Brazilian Intensive Care Unit. *Front Microbiol*. 2018;9:3198.
271. Lee CS, Vasoo S, Hu F, Patel R, Doi Y. *Klebsiella pneumoniae* ST147 coproducing NDM-7 carbapenemase and RmtF 16S rRNA methyltransferase in Minnesota. *J Clin Microbiol*. 2014;52(11):4109-10.
272. Moussounda M, Diene SM, Dos Santos S, Goudeau A, François P, van der Mee-Marquet N. Emergence of blaNDM-7-Producing *Enterobacteriaceae* in Gabon, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(2):356-8.
273. Tuon FF, Graf ME, Merlini A, Rocha JL, Stallbaum S, Arend LN, *et al*. Risk factors for mortality in patients with ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Braz J Infect Dis*. 2017;21(1):1-6.
274. Li L, Yu T, Ma Y, Yang Z, Wang W, Song X, *et al*. The Genetic Structures of an Extensively Drug Resistant (XDR) *Klebsiella pneumoniae* and Its Plasmids. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2019 [citado 2 de mayo de 2022];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00446>
275. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Comput Biol*. 2017;13(6):e1005595.
276. George S, Pankhurst L, Hubbard A, Votintseva A, Stoesser N, Sheppard AE, *et al*. Resolving plasmid structures in *Enterobacteriaceae* using the MinION nanopore sequencer: assessment of MinION and MinION/Illumina hybrid data assembly approaches. *Microb Genom*. 2017;3(8):e000118.
277. Pan YJ, Lin TL, Chen CT, Chen YY, Hsieh PF, Hsu CR, *et al*. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci Rep*. 2015;5(1):15573.
278. Struve C, Roe CC, Stegger M, Stahlhut SG, Hansen DS, Engelthaler DM, *et al*. Mapping the Evolution of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mBio*. 2015;6(4):e00630.

279. Shankar C, Jacob JJ, Vasudevan K, Biswas R, Manesh A, Sethuvel DPM, *et al.* Emergence of Multidrug Resistant Hypervirulent ST23 *Klebsiella pneumoniae*: Multidrug Resistant Plasmid Acquisition Drives Evolution. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10.
280. Shaidullina E, Shelenkov A, Yanushevich Y, Mikhaylova Y, Shagin D, Alexandrova I, *et al.* Antimicrobial Resistance and Genomic Characterization of OXA-48- and CTX-M-15-Co-Producing Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 Recovered from Nosocomial Outbreak. *Antibiotics.* 2020;9(12):E862.
281. Li W, Sun G, Yu Y, Li N, Chen M, Jin R, *et al.* Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Clin Infect Dis.* 2014;58(2):225-32.
282. Vogwill T, MacLean RC. The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. *Evol Appl.* 2015;8(3):284-95.
283. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol.* 2020;18(6):344-59.
284. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends Microbiol.* 2016;24(12):944-56.
285. Wyres KL, Hawkey J, Hetland MAK, Fostervold A, Wick RR, Judd LM, *et al.* Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(3):577-81.
286. Pitout JDD, Finn TJ. The evolutionary puzzle of *Escherichia coli* ST131. *Infect Genet Evol.* 2020;81:104265.
287. Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella pneumoniae* Clones ST307 and ST147. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(10):e01148-20.
288. Finney M. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Curr Prot in Mol Biol.* 2000;51(1):2.5B.1-2.5B.9.
289. Roe CC, Vazquez AJ, Esposito EP, Zarrilli R, Sahl JW. Diversity, Virulence, and Antimicrobial Resistance in Isolates From the Newly Emerging *Klebsiella pneumoniae* ST101 Lineage. *Front Microbiol.* 2019;10.
290. Yin L, He L, Miao J, Yang W, Wang X, Ma J, *et al.* Active surveillance and appropriate patient placement in contact isolation dramatically decreased carbapenem-resistant Enterobacterales infection and colonization in paediatric patients in China. *J of Hosp Infect.* 2020;105(3):486-94.
291. Chen CM, Guo MK, Ke SC, Lin YP, Li CR, Vy Nguyen HT, *et al.* Emergence and nosocomial spread of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-producing OXA-48 and KPC-2 in a regional hospital in Taiwan. *J of Med Microb.* 2018;67(7):957-64.

292. Adler A, Khabra E, Paikin S, Carmeli Y. Dissemination of the blaKPC gene by clonal spread and horizontal gene transfer: comparative study of incidence and molecular mechanisms. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(8):2143-6.
293. Villa L, Feudi C, Fortini D, Brisse S, Passet V, Bonura C, *et al.* Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microb Genom.* 2017;3(4):e000110.
294. Bonura C, Giuffrè M, Aleo A, Fasciana T, Bernardo FD, Stampone T, *et al.* An Update of the Evolving Epidemic of blaKPC Carrying *Klebsiella pneumoniae* in Sicily, Italy, 2014: Emergence of Multiple Non-ST258 Clones. *PLOS ONE.* 2015;10(7):e0132936.
295. Ruiz-Garbajosa P, Hernández-García M, Beatobe L, Tato M, Méndez MI, Grandal M, *et al.* A single-day point-prevalence study of faecal carriers in long-term care hospitals in Madrid (Spain) depicts a complex clonal and polyclonal dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(2):348-52.
296. Strydom KA, Chen L, Kock MM, Stoltz AC, Peirano G, Nobrega DB, *et al.* *Klebsiella pneumoniae* ST307 with OXA-181: threat of a high-risk clone and promiscuous plasmid in a resource-constrained healthcare setting. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(4):896-902.
297. Baquero F, Tedim AP, Coque TM. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. *Front Microbiol.* 2013;4:15.
298. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
299. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(4):335-41.
300. Snitkin ES, Zelazny AM, Thomas PJ, Stock F, NISC Comparative Sequencing Program Group, Henderson DK, *et al.* Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Sci Transl Med.* 2012;4(148):148ra116.
301. Mitchell SL, Simner PJ. Next-Generation Sequencing in Clinical Microbiology: Are We There Yet? *Clin Lab Med.* 2019;39(3):405-18.
302. Reuter S, Harrison TG, Köser CU, Ellington MJ, Smith GP, Parkhill J, *et al.* A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak. *BMJ Open.* 2013;3(1):e002175.
303. Wain J, Keddy KH, Hendriksen RS, Rubino S. Using next generation sequencing to tackle non-typhoidal *Salmonella* infections. *J Infect Dev Ctries.* 2013;7(1):1-5.
304. Köser CU, Holden MTG, Ellington MJ, Cartwright EJP, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, *et al.* Rapid Whole-Genome Sequencing for Investigation of a Neonatal MRSA Outbreak. *N Engl J Med.* 2012;366(24):2267-75.

305. Wain J, Mavrogiorgou E. Next-generation sequencing in clinical microbiology. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013;13(3):225-7.