



**Facultad  
de Química**



**UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY**



**PEDECIBA  
MEC-UDELAR**

**Tesis de Maestría**

**Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas**

**Análisis de plataformas genéticas codificantes de resistencia  
en *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa y  
evaluación de compuestos antibiofilm**

**B.C. Carmen Magallanes**

**Orientadora: Dra. Carolina Márquez**

**Co-orientadora: Dra. Q.F. Graciela Borthagaray**

**2025**

**Catedra de Microbiología Clínica**

**Departamento de Bioquímica Clínica**

**Facultad de Química, Udelar**

**Montevideo, Uruguay**



**AGENCIA NACIONAL  
DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN**

**Financiación:**

**Análisis de plataformas genéticas codificantes de resistencia en  
*Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa y evaluación de  
compuestos antibiofilm**

B.C. Carmen Magallanes

Tesis presentada con el objetivo de obtener el título de Magister en Química en el marco del  
programa de PEDECIBA

Tribunal:

Dra. Mariana Barraco

Dra. Paola Scavone

Dra. María Inés Bado

Orientadora: Dra. Carolina Márquez

Co-orientadora: Dra. Q.F. Graciela Borthagaray

Montevideo 2025

# Índice

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Resumen.....                                                                                              | 2  |
| Introducción.....                                                                                         | 5  |
| 1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> en entornos clínicos .....                                                | 5  |
| 2. Resistencia a los antibióticos en <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....                                   | 6  |
| 2.1 $\beta$ -lactámicos .....                                                                             | 6  |
| 2.2 Aminoglucósidos .....                                                                                 | 9  |
| 2.3 Fluoroquinolonas .....                                                                                | 10 |
| 2.4 Polimixinas .....                                                                                     | 10 |
| 3. Diseminación de plásmidos multirresistentes codificantes de carbapenemasas.....                        | 12 |
| 4. Virulencia en <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....                                                       | 13 |
| 5. Clonas de alto riesgo de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....                                            | 14 |
| 6. Aplicación de la secuenciación total de los genomas para el estudio de brotes intrahospitalarios ..... | 16 |
| 7. Tratamientos de las infecciones causadas por <i>K. pneumoniae</i> productoras carbapenemasa.....       | 17 |
| 8. Biofilm bacterianos .....                                                                              | 19 |
| 9. Agentes antibiofilm .....                                                                              | 21 |
| 9.1 Complejos metálicos .....                                                                             | 22 |
| 9.2 Sulfonamidas metálicas.....                                                                           | 23 |
| 9.3 Polioles metálicos.....                                                                               | 25 |
| Objetivos .....                                                                                           | 26 |
| Objetivo general.....                                                                                     | 26 |
| Objetivos específicos .....                                                                               | 26 |
| Estrategia de investigación.....                                                                          | 27 |
| Materiales y métodos.....                                                                                 | 29 |
| Aislamientos estudiados.....                                                                              | 29 |
| Estudio de los antibiotipos .....                                                                         | 31 |
| 1. Caracterización genética de los aislamientos.....                                                      | 31 |
| 1.1 Extracción de ADN y determinación de su calidad .....                                                 | 31 |
| 1.2 Ensamblaje y anotación de los genomas.....                                                            | 32 |
| 1.2.1 Análisis de calidad de las lecturas .....                                                           | 32 |
| 1.2.2 Ensamblaje de <i>novo</i> .....                                                                     | 33 |
| 1.2.3 Evaluación de la calidad del genoma ensamblado .....                                                | 33 |

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.2.4 Obtención de los pulidos de Nanopore con Illumina .....                              | 34 |
| 1.2.5 Anotación de los genomas .....                                                       | 35 |
| 1.3 Análisis genómico.....                                                                 | 35 |
| 2. Correlación del perfil de resistencia con el genotipo de resistencia .....              | 36 |
| 3. Análisis de la relación genética entre los aislamientos.....                            | 37 |
| 3.1 Análisis del pangenoma.....                                                            | 37 |
| 3.2 Extracción de SNPs del genoma núcleo .....                                             | 37 |
| 3.3 Análisis filogenético .....                                                            | 38 |
| 4. Análisis de las plataformas genéticas plasmídicas .....                                 | 38 |
| 5. Complejos metálicos y colistina .....                                                   | 39 |
| 5.1 Concentración inhibitoria mínima .....                                                 | 40 |
| 6. Producción de biofilm .....                                                             | 40 |
| 7. Evaluación de compuestos en su capacidad antibiofilm .....                              | 42 |
| 7.1 Inhibición de Biofilm .....                                                            | 42 |
| 7.2 Erradicación de Biofilm .....                                                          | 43 |
| Resultados y discusión .....                                                               | 45 |
| Estudio de los antibiotipos.....                                                           | 45 |
| Determinación de la CIM al colistin.....                                                   | 46 |
| 1. Caracterización genómica de los aislamientos .....                                      | 47 |
| 1.1 Secuenciación de genomas completos .....                                               | 47 |
| 1.2 Anotación de los genomas.....                                                          | 48 |
| 1.3 Análisis genómico.....                                                                 | 49 |
| 2. Correlación del perfil de resistencia con el genotipo de resistencia .....              | 57 |
| 3. Análisis de la relación genética entre los aislamientos.....                            | 61 |
| 3.1 Análisis del pangenoma secuencias ST437 .....                                          | 61 |
| 4.2 Análisis del pangenoma secuencias ST307 .....                                          | 66 |
| 4. Análisis de plataformas genéticas plasmídicas.....                                      | 70 |
| 4.1 Comparación del contenido plasmídico de los aislamientos productores de KPC-2 .....    | 70 |
| 4.2 Análisis del contenido plasmídico de los aislamientos ST307 productores de NDM-5 ..... | 74 |
| 4.3 Discusión plataformas genéticas plasmídicas de resistencia.....                        | 81 |
| 5. Evaluación de la CIM de los compuestos en estudio .....                                 | 84 |
| 6. Evaluación de la producción de biofilm de los aislamientos estudiados .....             | 85 |
| 6.1 Determinación de las condiciones óptimas de producción de biofilm .....                | 85 |
| 6.2 Evaluación de la producción de biofilm.....                                            | 87 |

|                                                                                    |     |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.3 Discusión formación de biofilm.....                                            | 88  |
| 7. Evaluación de la capacidad antibiofilm de compuestos metálicos y colistina..... | 90  |
| 7.1 Inhibición de biofilm por colistina.....                                       | 90  |
| 7.2 Inhibición de biofilm por complejos metálicos.....                             | 92  |
| 7.3 Erradicación de biofilm por complejos metálicos .....                          | 96  |
| 7.4 Discusión de los resultados de inhibición y erradicación de biofilm .....      | 101 |
| Conclusiones.....                                                                  | 103 |
| Anexo I: Primers y ciclos de PCR.....                                              | 105 |
| Bibliografía .....                                                                 | 106 |

## Agradecimientos

Quiero agradecer de todo corazón a todas esas personas que estuvieron a mi lado. Este trabajo de tesis no habría sido posible sin el apoyo, la guía y el amor de muchas personas que me acompañaron en este camino.

Un agradecimiento especial a mis tutoras Carolina y Graciela por su dedicación, paciencia y por haberme guiado con compromiso y generosidad durante todo el proceso.

Quiero agradecer profundamente a mi familia, el sostén más grande que tengo: mis padres, por su amor incondicional y por enseñarme con el ejemplo el valor del esfuerzo y la perseverancia. En especial a mi madre, gracias por confiar en mí, incluso en los momentos en que yo misma dudaba.

A mi hermana gemela, mi otra mitad en el mundo, mi compañera de vida. Gracias por ser mi refugio, mi fuerza y mi alegría constante. A mi cuñado por su gran disposición a compartir sus conocimientos informáticos. A mi sobrino Felipe por llenarme de amor y enseñarme que lo más simple es a veces lo más valioso.

A mi mejor amigo Daniel, por todas esas horas compartidas, las risas y el entendimiento. Por su constante apoyo. A mis amigas Victoria, Ana, Rosina, Camila y Nicol que siempre se hicieron de un tiempo para escucharme, y que siempre me dieron ánimos. Gracias por ser parte de este equipo que siempre me sostuvo. A mi amiga Zuly, que, aunque hace poco tiempo que nos conocemos, me ha brindado un apoyo inmenso y una confianza única. A Eliana, por todo su gran apoyo en el laboratorio, las horas compartidas escuchando radio y cantando. A Mercedes que me abrió las puertas y me dio su confianza.

Gracias a todas las personas que, de una u otra manera, formaron parte de este recorrido. Esta tesis también es de ustedes.

## Resumen

*Klebsiella pneumoniae* (*Kp*) es una bacteria oportunista asociada a infecciones intrahospitalarias graves, como neumonías, infecciones del tracto urinario, bacteriemias y heridas quirúrgicas. En los últimos años, su capacidad para adquirir diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos, incluyendo la producción de carbapenemasas, la ha convertido en una de las principales amenazas para la salud pública a nivel global. El surgimiento cada vez más frecuente de aislamientos pan-resistentes sumado con su habilidad de formación de biofilm, que dificulta los tratamientos con antibióticos, refuerzan la urgencia de desarrollar estrategias de vigilancia epidemiológica y la búsqueda de terapias alternativas o complementarias.

En este contexto, la presente tesis tuvo como objetivo contribuir al entendimiento de la resistencia antimicrobiana en *Kp* multiresistente y vías de diseminación de la misma, así como evaluar el potencial antibiofilm de distintos compuestos. Con este fin, se analizaron dos grupos de aislamientos clínicos de *Kp*: el primero representado por dos co-aislamientos pertenecientes a un brote de *Kp* productora de carbapenemasa tipo KPC (*Kp*-KPC) del año 2011, obtenidos simultáneamente de la herida quirúrgica de un paciente trasplantado; y el segundo por cinco aislamientos de *Kp* productores de metalocarbapenemasa tipo NDM (*Kp*-NDM) y resistentes a colistina, recolectados en 2023. Todos los aislamientos fueron caracterizados fenotípicamente, basado en el perfil de resistencia a antibióticos y en la capacidad de producción de biofilm. Además, los dos aislamientos *Kp*-KPC y 3 de los 5 aislamientos *Kp*-NDM fueron seleccionados para análisis genotípico mediante técnicas de secuenciación masiva para la identificación de genes de resistencia y el análisis de las plataformas genéticas involucradas. Por otro lado, se evaluaron el polipéptido colistina y varios complejos metálicos sintetizados localmente por la cátedra de Inorgánica de Facultad de Química, como potenciales agentes antibiofilm.

Todos los aislamientos presentaron un alto número de genes de resistencia a diferentes clases de antibióticos. Los aislamientos de *Kp*-KPC productores de KPC-2 (54-1 y 54-2) pertenecieron al secuenciotipo ST437 y fueron sensibles a la colistina. Los aislamientos de *Kp*-NDM revelaron la presencia de NDM-5, una variante recientemente reportada en nuestro país, y pertenecieron al secuenciotipo ST307, un clon epidémico de alto riesgo introducido hace poco en la región. Además, presentaron valores de concentración inhibitoria mínima a la colistina entre 16 y 64 µg/mL.

Basado en el cgMLST y en la diferencia en el número de SNPs se observó que los aislamientos de *Kp*-KPC (54-1 y 54-2) pertenecieron al mismo clon (diferencia de 6 SNPs), mientras que los aislamientos de *Kp*-NDM pertenecieron a dos clones distintos (distinto valor de cgMLST y diferencia de 70 SNPs).

El gen *bla*<sub>KPC-2</sub> se localizó en un plásmido IncN formando parte de un transposón Tn4401. Los plásmidos IncN compartieron un alto porcentaje de homología, y su composición denotaba una estructura simple con *bla*<sub>KPC-2</sub> como único gen de resistencia. A diferencia de este, el gen *bla*<sub>NDM-5</sub> fue encontrado en plásmidos multireplicones IncR/incN e IncFIB/IncFII de 48 y 230 kb respectivamente. En todos los casos el entorno genético de *bla*<sub>NDM-5</sub> fue similar ( $\Delta$ ISA-ba125/*bla*<sub>NDM-5</sub>/*ble*MBL/*trpF*/*dsbD*) y se encontró formando parte de una región multirresistente de aproximadamente 20 Kb compuesta por múltiples secuencias móviles (Iss, Tn, integron) y genes de resistencia a diferentes clases de antibióticos. Dos de los tres aislamientos *Kp*-NDM tuvieron dos copias de *bla*<sub>NDM-5</sub> en distintos plásmidos.

Dos de los aislamientos estudiados, revelaron la presencia de la  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido CTX-M-15. El gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> que codifica para dicha enzima se localizó en plásmidos con distinto grupo de incompatibilidad: IncFIB, IncHI2/ IncHI2A/RepA y IncFIB/IncFII, formando parte de regiones multirresistentes de 20Kb con alto contenido de elementos genéticos móviles. El entorno genético de este gen fue conservado en todos los casos, con la organización típica *ISEcp1/bla*<sub>CTX-M-15</sub>/*wbuC*/*tnpA*. En uno de los aislamientos, se identificaron 3 copias de *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, ubicadas en plásmidos diferentes. En uno de ellos, se observó un evento de intercambio genético, donde *bla*<sub>NDM-5</sub> fue sustituido por *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, evidenciando la plasticidad de estos genes.

Los plásmidos multirresistentes codificantes de *bla*<sub>NDM-5</sub> o *bla*<sub>CTX-M-15</sub> albergan un alto número de genes de resistencia, lo que implica que su transferencia está asociada a la co-transferencia de múltiples genes de resistencia de importancia clínica, facilitando la diseminación de la misma y dando lugar al origen de aislamientos multirresistentes. Además, la capacidad de NDM-5 y CTX-M-5 de integrarse en plásmidos con múltiples orígenes de replicación pone de manifiesto las estrategias de diseminación que facilitan su persistencia en los clones epidémicos de alto riesgo y contribuyen a su éxito en los entornos hospitalarios.

Todos los aislamientos mostraron capacidad para formar biofilm, siendo catalogados como moderados o fuertes productores. Por otro lado, se evaluó la capacidad de distintos compuestos para inhibir y/o erradicar el biofilm de *Kp*. La colistina fue capaz de inhibir la formación de biofilm

a concentraciones sub inhibitorias, mostrando una mayor efectividad en los aislamientos resistentes a este antibiótico. Se encontró que algunos complejos metálicos presentaron una actividad antibiofilm significativa. Entre ellos, las sulfonamidas de plata mostraron los mejores resultados tanto en la inhibición como en la erradicación del biofilm, abriendo nuevas posibilidades en la búsqueda de estrategias terapéuticas complementarias.

Esta tesis integra el análisis genómico y fenotípico para aportar conocimiento sobre la resistencia y diseminación de *Kp* multirresistente en Uruguay, destacando la emergencia del clon de alto riesgo ST307 y la detección por primera vez de la metalo- $\beta$ -lactamasa NDM-5 en nuestro país. Asimismo, este trabajo ofrece una aproximación preliminar al uso de nuevos compuestos metálicos como potenciales agentes antibiofilm.

# Introducción

## 1. *Klebsiella pneumoniae* en entornos clínicos

*Klebsiella pneumoniae* (*Kp*) es un bacilo gramnegativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* orden Enterobacterales, ampliamente reconocido como un patógeno oportunista en infecciones intrahospitalarias.

*Kp* forma parte de la microbiota intestinal normal de los humanos, animales domésticos y de producción (bovinos, porcinos, aves, caballos, perros, gatos), y puede encontrarse también en el medio ambiente, habitando el agua y los suelos (Navon-Venezia et al., 2017) (Brisse et al., 2006). Sin embargo, bajo ciertas condiciones, *Kp* puede adquirir factores de virulencia y mecanismos de resistencia a los antibióticos que le permiten causar infecciones graves y de difícil tratamiento, especialmente neumonía asociada a ventilación mecánica, infecciones del tracto urinario complicadas, bacteriemia, infecciones de heridas y abscesos hepáticos. Esto hace que sea de gran relevancia como patógeno en las áreas de cuidado intensivos, y en pacientes inmunodeprimidos (Paczosa & Mecsas, 2016).

La importancia de *Kp* en el ambiente hospitalario se ha visto aumentada en los últimos años debido a su capacidad para adquirir y diseminar genes de resistencia a los antibióticos. Naturalmente *Kp* contiene en su ADN cromosomal el gen codificante de la enzima  $\beta$ -lactamasa SHV-1, la cual le confiere resistencia a la ampicilina, ticarcilina y piperacilina, por lo tanto, este perfil de resistencia corresponde al fenotipo salvaje de *Kp* (Paterson et al., 2003). Con el uso y abuso de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, han ido apareciendo de forma progresiva  $\beta$ -lactamasas con espectros hidrolíticos cada vez más amplios, como las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), y las carbapenemasas (Livermore, 2012) (Bradford, 2001). Además, las bacterias que albergan genes de carbapenemasa suelen ser también resistentes a otros antibióticos, lo cual contribuye a un aumento de las tasas de morbilidad y mortalidad de los pacientes infectados (Qureshi et al., 2012) (Gasink et al., 2009). Esto ha dado lugar al surgimiento de cepas de *Kp* resistente a múltiples drogas de gran importancia a nivel mundial, siendo catalogadas como multidroga resistentes (MDR) aquellas cepas con resistencia adquirida a al menos un agente en tres o más categorías de antimicrobianos; extensamente resistente (XDR) a cepas resistentes a al menos un agente en todas, excepto en dos o menos, categorías de antimicrobianos (es decir, los aislamientos bacterianos permanecen

susceptibles únicamente a una o dos categorías); y pan resistentes (PDR) definido como cepas resistentes a todos los agentes en todas las categorías de antimicrobianos (Magiorakos et al., 2012). En particular, la aparición de aislamientos productores de carbapenemasas, como KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) y NDM (Nueva Delhi metalo- $\beta$ -lactamasa), ha generado un gran desafío clínico, limitando las opciones terapéuticas (Wyres & Holt, 2016). La tigeciclina, los aminoglucósidos y las polimixinas (polimixina B y colistina) son actualmente las mejores opciones de tratamiento para las cepas productoras de carbapenemasas (Hirsch & Tam, 2010). La facilidad con que se transmite este microorganismo ha llevado a la aparición de brotes intrahospitalarios con mayor frecuencia, teniéndose que implementar medidas de control y de vigilancia epidemiológica (Martin & Bachman, 2018).

La capacidad de *Kp* para sobrevivir en entornos hospitalarios también se ve favorecida por su resistencia a la desecación y a su capacidad de formar biofilms, provocando infecciones persistentes y difíciles de erradicar (Shon et al., 2013). Estos factores han llevado a que los Enterobacterales productores de carbapenemasa sean incluidas en la lista de patógenos prioritarios de la OMS, donde están clasificados como patógenos de prioridad crítica. Convirtiéndose en uno de los principales objetivos en la investigación sobre resistencia antimicrobiana y en el desarrollo de nuevas medidas de tratamiento y prevención (World Health Organization, 2024).

## 2. Resistencia a los antibióticos en *Klebsiella pneumoniae*

*Kp* es uno de los patógenos más relevantes en los entornos hospitalarios debido a su gran capacidad para desarrollar y acumular mecanismos de resistencia a múltiples clases de antibióticos. Su evolución hacia fenotipos multirresistentes se debe a la adquisición de genes de resistencia a través de elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones. Hasta el momento se han documentado cepas de *Kp* resistentes a  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y colistina, lo que ha limitado significativamente las opciones terapéuticas (Pitout et al., 2015).

### 2.1 $\beta$ -lactámicos

Los  $\beta$ -lactámicos son antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana y se definen químicamente por la presencia de un anillo  $\beta$ -lactámico en su estructura química. Los  $\beta$ -

lactámicos constituyen una familia extensa de antibióticos que tienen la característica de tener baja toxicidad, ser bien tolerados, y ofrecer múltiples vías de administración (Suárez & Gudiol, 2009). Los distintos ligandos que se unen a los anillos lactámicos determina las propiedades antibacterianas de los compuestos y resultan en diferentes grupos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas. Pequeñas modificaciones de la estructura química llevan a las variantes dentro de cada grupo, teniendo como resultados diferencias en el espectro de acción, en la afinidad por los receptores celulares, y en la resistencia a las enzimas  $\beta$ -lactamasas (García et al., 1999).

Los  $\beta$ -lactámicos actúan interrumpiendo la formación de la pared celular bacteriana, mediante la inhibición de la transpeptidación, último paso para la formación del peptidoglicano, una molécula clave en la estructura de la pared celular de las bacterias gram negativa y gram positivas. El anillo  $\beta$ -lactámico presenta una similitud estructural con las proteínas de unión a la penicilina (PBP), cuya función es catalizar la reacción de entrecruzamiento de los peptidoglicanos. La unión covalente del antibiótico con las PBP provoca la acumulación de precursores del peptidoglicano sin entrecruzar, debilitando la pared celular. Como resultado, las bacterias se vuelven susceptibles a la presión osmótica, lo que conduce a la lisis celular y muerte bacteriana (Latorre-Barragan et al., 2019). Además de inhibir la síntesis de la pared bacteriana, los  $\beta$ -lactámicos también pueden activar autolisinas, que ayudan a degradar el peptidoglicano acelerando la destrucción celular (Marín & Gudiol, 2003).

Con el uso de los  $\beta$ -lactámicos, las bacterias fueron desarrollando mecanismos de resistencia que le permiten sobrevivir en presencia del antibiótico. En las bacterias Gram negativas el mecanismo de resistencia por excelencia a los  $\beta$ -lactámicos es la producción  $\beta$ -lactamasas, enzimas que son capaces de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico. Otros mecanismos incluyen la producción de bombas de eflujo y la alteración de la permeabilidad mediante la reducción y/o ausencia de porinas, impidiendo el acceso del antibiótico a la bacteria (Gómez et al., 2015).

Las  $\beta$ -lactamasas constituyen un grupo diverso de enzimas hidrolíticas que tiene diferente espectro de acción y se las ha clasificado según su estructura, su capacidad hidrolítica, y espectro de inhibidores, siendo las clasificaciones de Ambler y Bush-Jacoby-Medeiros las más usadas en la actualidad (Perez et al., 2007).

Las  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro pertenecen al grupo 2b y solo actúan frente a penicilinas y cefalosporinas de espectro reducido. Una de las mayores preocupaciones clínicas en los

enterobacteriales es la adquisición de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas (Nordmann et al., 2009). Las BLEE son enzimas que se caracterizan por ser capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera y cuarta generación, así como los monobactámicos. Sin embargo, suelen ser inhibidas por ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam. Estas enzimas son principalmente variantes de las familias TEM, SHV y CTX-M (Pitout & Laupland, 2008).

Las carbapenemasas son  $\beta$ -lactamasas con capacidad de hidrolizar los carbapenémicos (imipenem, meropenem, doripenem y ertapenem) y la mayoría tienen también capacidad de hidrolizar en cierto grado las cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación. Estas enzimas se clasifican según la clasificación molecular de Ambler en tres grupos principales: clase A, clase B y clase D, basado en su estructura molecular, mecanismo de acción y espectro de inhibidores (Ambler, 1980).

Las carbapenemasas de clase A son  $\beta$ -lactamasas que utilizan una serina en su sitio activo. Dentro de este grupo, la más relevante es la enzima KPC, que tiene la característica de ser inhibida por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como avibactam y relebactam (Kazmierczak et al., 2016). El primer informe de la carbapenemasa tipo KPC tuvo lugar en 1996, en Carolina del Norte, donde se encontró en un aislamiento de *Kp* que le dio su nombre, desde entonces, se han identificado aislamientos de *Kp* y de otras enterobacterias productores de KPC en Europa, Asia, Medio Oriente, América Central y del Sur, África y Oceanía. (Escandón-Vargas et al., 2017) (L. Chen et al., 2012). Las carbapenemasas de clase B, también denominadas metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL), contienen iones de zinc en su sitio activo. Algunas de las más diseminadas en ámbito clínico son NDM (Nueva Delhi metalo- $\beta$ -lactamasa), VIM (Verona integron-encoded metalo- $\beta$ -lactamase) e IMP (Imipenemase metalo- $\beta$ -lactamase). Estas enzimas no son inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas convencionales, sin embargo, pueden ser inhibidas por agentes quelantes del zinc como el EDTA (Mojica et al., 2022).

Finalmente, las carbapenemasas de clase D, pertenecientes a la familia de las oxacilinasas (OXA), presentan un mecanismo de hidrólisis basado en la serina en su sitio activo, pero con una menor afinidad por los carbapenémicos en comparación con las clases A y B. La enzima más relevante dentro de este grupo es OXA-48 y sus variantes, que han sido responsables de brotes hospitalarios en múltiples regiones del mundo. Aunque estas carbapenemasas presentan una actividad más débil sobre los carbapenémicos en comparación con KPC o NDM, su presencia combinada con otras  $\beta$ -lactamasas o con la pérdida de porinas puede generar altos niveles de resistencia. Las

carbapenemasa de clase D no son inhibidas por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas convencionales ni por los agentes quelantes, por lo que su identificación fenotípica suele ser un desafío. (Poirel et al., 2012).

Los inhibidores de  $\beta$ -lactamasa son un grupo de moléculas que tienen capacidad para inactivar las  $\beta$ -lactamasas y se administran en combinación con un  $\beta$ -lactámico, de modo que el inhibidor bloquea la enzima y restaura la eficacia del antibiótico asociado (Acevedo Cepeda et al., 2021). El mecanismo de acción de estos inhibidores varía según su estructura química. Los inhibidores clásicos como el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam actúan como “inhibidores suicidas”, se unen de forma irreversible al sitio activo de la  $\beta$ -lactamasa formando un complejo acil-enzima que inactiva la enzima. Estos inhibidores tienen buena actividad contra las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, pero son ineficaces frente a carbapenemasas. Por lo que se usan con frecuencia en combinación con antibióticos como amoxicilina, ampicilina o piperacilina (Rodríguez-Baño et al., 2018). Los Inhibidores no  $\beta$ -lactámicos como el avibactam y el relebactam se unen de manera reversible a las  $\beta$ -lactamasas, inhibiendo su actividad sin ser destruidos en el proceso, lo que les confiere una mayor estabilidad y un espectro de acción más amplio. Además de inactivar las BLEE, estos inhibidores son eficaces contra las carbapenemasas de clase A y algunas oxacilinasas, y se los usa en combinación con ceftazidima y meropenem respectivamente (Takemoto et al., 2024) (Boattini et al., 2025).

## 2.2 Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos, como la gentamicina, la amikacina y la tobramicina, son antibióticos bactericidas que ejercen su efecto inhibiendo la síntesis de proteínas al unirse a la subunidad ribosomal 30S. *Kp* ha desarrollado resistencia a estos antibióticos principalmente a través de la adquisición de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA), las cuales inactivan el antibiótico antes de que pueda ejercer su efecto. Otros mecanismos de resistencia son las mutaciones en la subunidad 30S del ribosoma, dando lugar a una menor afinidad del antibiótico por su diana, las alteraciones en las porinas que disminuyen la permeabilidad de la pared bacteriana y las bombas de eflujo que expulsan el antibiótico fuera de la célula (Lepe & Martínez-Martínez, 2022). Los EMA son principalmente acetiltransferasas (AAC), adeniltransferasas (ANT) y fosfotransferasas (APH) y por lo general suelen estar localizados en plásmidos. En *Kp* los genes

de resistencia más frecuentes son *aac(6')-Ib*, *aac(3)-IIa*, *ant(2'')-Ia* y *aph(3')-VIa* y *aadA* (González & Nieves, 2016).

Por otro lado, los genes plasmídicos *armA* y *rmtB*, actúan como metiltransferasas del ARN ribosomal 16S modificando el sitio de unión al ribosoma, confiriendo resistencia de alto nivel a todos los aminoglucósidos. Su presencia en cepas de *Kp* ha sido reportada con gran frecuencia (Galimand et al., 2003) (Doi et al., 2016).

### 2.3 Fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas, como la ciprofloxacina y la levofloxacina, inhiben la ADN girasa y la topoisomerasa IV, interrumpiendo la replicación del ADN bacteriano. La resistencia en *Kp* se debe a mutaciones cromosómicas y a la adquisición de genes plasmídicos.

Las principales mutaciones afectan los genes *gyrA* y *parC*, que codifican la ADN girasa y la topoisomerasa IV, respectivamente. Mutaciones específicas, como S83L y D87N en *gyrA*, o S80I y E84V en *parC*, reducen la afinidad de las fluoroquinolonas por sus dianas, disminuyendo su efectividad (Bagel et al., 1999). Por otro lado, la sobreexpresión de bombas de eflujo, como las codificadas por *oqxA* y *oqxB*, expulsa activamente el antibiótico fuera de la célula. Estos genes pueden estar localizados en el cromosoma o encontrarse en plásmidos (Amereh et al., 2023). Adicionalmente, la presencia de proteínas protectoras del ADN, como QnrA, QnrB y QnrS, interfiere con la unión de las fluoroquinolonas a sus blancos terapéuticos, disminuyendo su efecto bactericida. Los genes *qnr* son de origen plasmídico y se ha visto que confieren bajos niveles de resistencia a estos antibióticos (Jacoby et al., 2006). Además, el gen plasmídico *aac(6')-Ib-cr* confiere resistencia tanto a aminoglucósidos como a las fluoroquinolonas, en particular, ciprofloxacina y norfloxacina. La enzima acetiltransferasa que codifica dicho gen es capaz de modificar tanto a los aminoglucósidos como a las fluoroquinolonas, lo que confiere bajos niveles de resistencia a ambas familias de antibióticos (Gharbi et al., 2023). Se ha descrito la resistencia a fluoroquinolonas puede aumentar significativamente cuando los genes *qnr* y *aac(6')-Ib-cr* están presentes simultáneamente, ejerciendo un efecto sinérgico (Eftekhari & Seyedpour, 2015).

### 2.4 Polimixinas

Las polimixinas, principalmente colistina y polimixina B, son drogas que se utilizan en la clínica como último recurso para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes.

La falta de antibióticos efectivos contra estas bacterias ha llevado a la necesidad de revivir viejos antibióticos tales como las polimixinas, que dado sus efectos nefrotóxicos y su estrecho margen terapéutico habían quedado en desuso (Nang et al., 2019). De forma inevitable, su reintroducción en la clínica ha causado el aumento del reporte de resistencia en bacterias gram negativas. La colistina (polimixina E) es la droga disponible actualmente en nuestro país (Medina, 2017). Se trata de un polipéptido catiónico que actúa alterando la permeabilidad de la pared bacteriana de los Gram negativos mediante la interacción electrostática con el grupo fosfato del lípido A del lipopolisacárido (LPS) (Janssen et al., 2020). La resistencia a colistina se da mediante la adición de moléculas con cargas positivas como ser 4-amino-4-deoxi-L-arabinosa (L-Ara4N) y fosfoetanolamina (pEtN) al lípido A. Estos grupos disminuyen la carga negativa haciendo ineficiente la interacción electrostática e impidiendo la acción de la colistina (Uzairue et al., 2022). Estas modificaciones en el lípido A pueden ser originadas por mutaciones puntuales en genes cromosómicos o por la acción del gen plasmídico de resistencia a colistina *mcr* (mobilized colistin resistance). En *Kp* las mutaciones en genes cromosómicos involucran a los sistemas de dos componentes PhoPQ y PmrAB y a su regulador MgrB (Poirel et al., 2015). La inactivación del gen *mcrB* lleva a la sobreexpresión de los sistemas PhoPQ y PmrAB, que termina en última instancia favoreciendo la adición de los grupos catiónicos al LPS. Una gran variedad de mutaciones puntuales, así como inserciones y deleciones se han reportado en estos genes como causa resistencia a colistina (Poirel et al., 2017). Por otro lado, el descubrimiento en 2015 del gen de resistencia plasmídico *mcr* ha sido de gran preocupación a nivel mundial, dada la posibilidad de transferencia horizontal de resistencia a colistina (Liu et al., 2016). El gen *mcr* codifica para una fosfoetanolamina transferasa que adiciona pEtN al LPS. Desde su descubrimiento se han reportado 10 variantes de *mcr* en diversos tipos de plásmidos, como IncI2, IncHI2, IncX4, IncFII y ColE, la mayoría en bacterias Gram negativas de origen animal (Wang et al., 2020).

En suma, la capacidad de *Kp* para adquirir determinantes de resistencia a diferentes familias de antibióticos ha contribuido a la emergencia y propagación de cepas multirresistentes e incluso panresistentes en entornos hospitalarios. La transmisión de estos mecanismos de resistencia ocurre principalmente a través de plásmidos conjugativos, lo que facilita la diseminación de genes de resistencia entre diferentes cepas de *Kp* y otras especies bacterianas (Carattoli, 2013). Además, la localización de múltiples genes de resistencia en un mismo plásmido favorece su cotransferencia,

lo que potencia la diseminación simultánea de resistencia a diferentes clases de antibióticos en un solo evento de transferencia genética.

### 3. Diseminación de plásmidos multirresistentes codificantes de carbapenemasas

La diseminación de los genes de carbapenemasa ocurre principalmente a través de plásmidos, elementos genéticos móviles de transferencia horizontal. Los genes de carbapenemasa están frecuentemente asociados a elementos genéticos como transposones, integrones y secuencias de inserción, localizados en plásmidos conjugativos, lo que facilita su integración y propagación en diferentes contextos genéticos (Partridge et al., 2018). Los plásmidos que portan genes de carbapenemasa suelen ser de gran tamaño y pertenecen a diversos grupos de incompatibilidad (Inc), siendo los más frecuentes IncF, IncN, IncL/M e IncX. Por otro lado, la pertenencia de múltiples grupos de Inc en estos plásmidos permite la coexistencia con otros plásmidos en la misma célula bacteriana y aumenta la carga genética de resistencia (Rozwandowicz et al., 2018). Los plásmidos que portan estos genes de carbapenemasa también codifican para genes de resistencia a otros antibióticos como ser aminoglucósidos, fluoroquinolonas y sulfonamidas, generando plásmidos multirresistentes con el potencial de co-transferir resistencia a múltiples antibióticos (Wyres et al., 2020).

Los tipos de plásmidos que contienen el gen *bla*<sub>KPC</sub> en aislamientos de *Kp*, pertenecen a diferentes grupos de incompatibilidad tales como IncF, IncI2, IncX, IncA/C, IncR, IncL/M y ColE1, siendo el grupo de incompatibilidad IncF, el predominante (Andrade et al., 2011). Las enzimas KPC comprenden 264 variantes de las cuales KPC-2 y KPC-3 son las más reportadas (Nordmann et al., 2009) (Naas et al., 2017). Los genes *bla*<sub>KPC</sub> que codifican para estas enzimas suelen ser parte de un transposón Tn4401 (Doumith et al., 2017).

Los plásmidos que portan *bla*<sub>NDM-1</sub> varían entre 30-300 kb, y existen en diferentes grupos de incompatibilidad: IncA/C, IncL/M, and IncR (Gamal et al., 2016) (Carattoli, 2009). Hasta la fecha se han reportado 84 subtipos de NDM (Naas et al., 2017), siendo NDM-1 la más prevalente a nivel mundial. NDM-1 está ampliamente distribuida en las Enterobacterias y otras bacterias Gram negativas (Wu et al., 2019). El gen *bla*<sub>NDM-1</sub> casi siempre se encuentra asociado con diversas secuencias de inserción, lo que contribuye a su rápida diseminación (Loh et al., 2020). Se cree que el origen de *bla*<sub>NDM</sub> proviene del cromosoma de *Acinetobacter baumannii* y que en un principio

estaba flanqueado por secuencias IS*Aba125* a ambos lados, dando lugar al transposón Tn125 (Poirel, et al., 2012). Los múltiples eventos de movilización hicieron que el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> fuera encontrado siendo parte de regiones de resistencia a múltiples drogas (RMD) de varios plásmidos en distintas especies bacterianas, con deleciones y proteínas codificadas truncadas. A pesar de estos múltiples eventos, el entorno genético de *bla*<sub>NDM</sub> sigue consistiendo en una secuencia truncada IS*Aba125* corriente arriba y el gen de resistencia a la bleomicina (*ble*<sub>MBL</sub>) corriente abajo (Wu et al., 2019). Además del transposón, las secuencias de inserción e integrones han estado implicados en la movilización del gen *bla*<sub>NDM</sub>. La rápida diseminación de estos elementos móviles ha contribuido a la gran dispersión y alta prevalencia de esta metalo-carbapenemasa representando una amenaza significativa para la salud pública a nivel mundial (Guducuoglu et al., 2018).

#### 4. Virulencia en *Klebsiella pneumoniae*

La virulencia es una característica clave que permite aumentar el potencial patogénico de una bacteria, en *Kp* se ha visto que los factores de virulencia que le han dado éxito a las cepas hipervirulentas (*kphv*) se asocian a varios mecanismos que incluyen: sistemas de captación de hierro, vías del metabolismo de alantoína, porinas, sistemas de expulsión, fimbrias, presencia de polisacárido capsular y síntesis del lipopolisacárido (Arena et al., 2017)(Russo et al., 2018). La evolución de estos factores de virulencia en *Kp* dio surgimiento al fenotipo hipermucoviscoso, caracterizado por una abundante producción de material capsular relacionado con la adquisición de plásmidos que contienen los genes *rmpA* y *rmpA2* (Chang et al., 2013) y asociado con el *String Test* (prueba del estiramiento mucoide) positivo (Yan et al., 2024).

El hierro constituye una molécula de vital importancia para determinados metabolismos celulares en bacterias, en los humanos un grupo de proteínas séricas limitan la accesibilidad al mismo para los microorganismos. Sin embargo, bacterias patógenas como *Kp* poseen genes codificantes de moléculas quelantes de hierro denominadas sideróforos, las cuales se unen a las moléculas de hierro de bajo peso molecular y los transportan al interior de la célula bacteriana, otorgándole al microorganismo las concentraciones micromolares necesarias para su crecimiento y supervivencia. *Kphv* puede producir cuatro sideróforos: enterobactina, yersiniabactina, salmoquelina y aerobactina, cuya afinidad con el hierro es variable (Choby et al., 2020). Se ha visto que los sideróforos enterobactina y yersiniabactina están codificados por genes

cromosomales, mientras que la secreción de salmoquelina y aerobactina se encuentran asociadas a elementos móviles transferibles (Russo et al., 2015).

La producción de cápsula constituye uno de los factores de virulencia más importantes de *Kp*. La capsula recubre a la bacteria y está formado por repeticiones de oligosacáridos de 4 a 6 subunidades de azúcares: manosa, ramnosa, galactosa, piruvato y residuos de fucosa (Ko, 2017). La variabilidad estructural de la cápsula ha permitido la clasificación en tipos capsulares (KL) cuyo grado de virulencia varían de acuerdo al contenido de manosa y/o ramnosa. La estructura genética involucra un grupo de genes que median la biosíntesis, transporte y ensamblaje de la cápsula en *Kp*. Estos genes se encuentran en el loci *cps*, sintetizados por el operón *cps* (*galF*, *acidPPC*, *wzi*, *wza*, *wzb* y *wzc*) (Ramos et al., 2012). La cápsula ofrece a la bacteria mayor robustez, permitiendo evadir el sistema inmune mediante el impedimento de la fagocitosis y la unión del complemento. Además, favorece el incremento de capacidad de producción de biofilm (Paczosa & Mecsas, 2016).

El lipopolisacárido (LPS) constituye el principal componente de la membrana celular externa en las bacterias Gram negativas. Está compuesto de 3 dominios estructurales: el lípido A, que se encuentra anclado en la membrana celular externa, el oligosacárido que forma la parte media del LPS y el polisacárido de cadena larga o antígeno O, que es el componente exterior del LPS, y por lo tanto es el blanco principal de la respuesta humoral del hospedero (Ramos et al., 2012). El LPS juega un rol importante en la estabilidad y protección contra el medio externo y su modificación favorece la adaptación y supervivencia de la bacteria al medio ambiente

En *Kp* la variabilidad en la estructura del antígeno O confiere diferentes fenotipos antigénicos que ofrecen protección contra los componentes del sistema de complemento. Actualmente existen varios grupos antigénicos, cuya biosíntesis se encuentra mediada por las enzimas codificadas por un grupo de seis genes que forman el cluster *wb* (*wzm*, *wzt*, *wbbM*, *glf*, *wbbN* *wbbO*) (Doorduyn et al., 2016).

## 5. Clonas de alto riesgo de *Klebsiella pneumoniae*

*Kp* es un patógeno de gran relevancia clínica debido a su capacidad de adquirir y diseminar genes de resistencia a antibióticos. Dentro de esta especie, ciertas clonas han emergido como linajes de alto riesgo, caracterizados por su elevada capacidad de diseminación, virulencia y resistencia a los antimicrobianos. Estas clonas de alto riesgo han sido responsables de brotes hospitalarios en diversas regiones del mundo, contribuyendo significativamente a la crisis de la resistencia a los

antibióticos (Wyres & Holt, 2016). Para el seguimiento y tipificación de las clonas a nivel mundial se utiliza la metodología de MLST (*Multi locus sequence type*), la cual se basa en la comparación de la secuencia de siete genes de referencia los cuales están presentes en todas las cepas de *Kp*. Estos genes son *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *recA* y *tonB* (Diancourt et al., 2005). Para cada fragmento secuenciado de cada gen se consideran los polimorfismos genéticos y la combinación de todos los alelos forman el perfil alélico o ST (*sequence type*) (Singh et al., 2006).

Los estudios genómicos han identificado varios secuenciotipos (ST) dentro de *Kp* que presentan una distribución global y están fuertemente asociados con la resistencia a carbapenémicos y otros antibióticos de última línea. Entre los más relevantes se encuentran ST258, ST11, ST15, ST147, ST307 y ST437, los cuales han sido implicados en brotes hospitalarios y presentan una alta capacidad de adquisición de plásmidos de resistencia (Pitout et al., 2015).

El ST258 es el linaje predominante a nivel global entre las cepas productoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa), especialmente en Norteamérica y Europa. Se trata de un linaje hiperendémico caracterizado por su notable capacidad de diseminación y su gran plasticidad genética, que le facilita la adquisición de genes de resistencia a los antibióticos (Bowers et al., 2015). ST258 pertenece al complejo clonal 258 (CC258), un grupo filogenéticamente relacionado que incluye otros secuenciotipos estrechamente vinculados, como ST11, ST340, ST437 y ST512, entre otros. Estas clonas comparten un alto grado de similitud en su perfil genético, diferenciándose principalmente por la acumulación de mutaciones puntuales. ST258, en particular, ha evolucionado mediante la recombinación de dos linajes ancestrales de *Kp*, lo que ha dado lugar a su diversidad genética y a su capacidad de adaptación en distintos ambientes hospitalarios (Peirano et al., 2017).

El clon ST437, que pertenece al CC 258, se ha identificado en diversas regiones del mundo, incluyendo América del Norte, Europa y Asia. Este secuenciotipo está frecuentemente asociado con la producción de carbapenemasas, entre las que se encuentran: NDM-5 Identificada en cepas aisladas de Italia e India (Ranieri et al., 2024) (S. Sahoo et al., 2023), OXA-232 detectada en cepas de China (Weng et al., 2020), y KPC-2 reportada en cepas de Brasil y Canadá (P. S. Pereira et al., 2013). Además de las carbapenemasas, las cepas ST437 suelen portar genes de resistencia, como *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. (Ranieri et al., 2024).

El secuenciotipo ST307 ha ganado relevancia en los últimos años, siendo identificado en diversos países y asociado frecuentemente con la producción de NDM (*New Delhi metallo-β-lactamase*).

Este linaje se ha diseminado en Asia, Europa y América Latina, mostrando una alta capacidad de persistencia en entornos hospitalarios llegando incluso a desplazar al clon de alto riesgo ST258 en algunas regiones de Europa (Villa et al., 2017) (Peirano et al., 2020). En América Latina, se ha observado un aumento en la prevalencia de ST307 en los últimos años, lo que sugiere una posible diseminación clonal de cepas resistentes a carbapenémicos en la región (Cejas et al., 2019). En particular, en países como Argentina y Uruguay, el ST307 ha sido reportado en cepas productoras de KPC y/o NDM, (González-Espinosa et al., 2024) (Magallanes et al., 2025) (Papa-Ezdra et al., 2024).

A nivel global, *Kp* ha sido reconocido como un patógeno prioritario en la lista de la OMS para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos debido a su resistencia a carbapenémicos y a la alta mortalidad asociada con sus infecciones (World Health Organization, 2024).

## 6. Aplicación de la secuenciación total de los genomas para el estudio de brotes intrahospitalarios

La electroforesis en gel por campo pulsante de los fragmentos de macrorestricción del ADN cromosomal (EGCP) es el método molecular de referencia utilizado en la investigación epidemiológica de brotes. Idealmente los pulsotipos de los aislamientos de un brote se espera que sean indistinguibles. En consideración de que pueden ocurrir eventos genéticos al azar, los cuales pueden alterar el perfil de macrorestricción en la cepa epidémica en el curso de un brote (alteración de sitio de restricción, inserciones o deleciones de ADN asociados a plásmidos, bacteriófagos o elementos transponibles), se requiere de un criterio interpretativo que permita distinguir las verdaderas diferencias debidas a eventos genéticos al azar de aquellas que correspondan a diferencias entre cepas endémicas. El criterio interpretativo de Tenover (Tenover et al., 1995), considera que durante un brote bien definido puede ocurrir un evento genético que altera el patrón de macro restricción hasta en dos a tres bandas, teniendo en cuenta que el brote puede involucrar numerosos pacientes, y numerosas generaciones bacterianas.

La secuenciación total de genomas (*Whole Genome Sequencing*, WGS) es una técnica que ha comenzado a ser usada a nivel mundial para la identificación de grupos de transmisión en brotes hospitalarios, destacándose por su mayor poder resolutivo en comparación con los métodos tradicionales de tipificación genética como EGCP. En 2012, la agencia de salud pública británica *Public Health England* publicó el primer estudio a escala poblacional que demostró la utilidad de

la secuenciación de genomas completos en epidemiología. En este estudio, se secuenciaron 247 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* aisladas en Oxfordshire entre los años 2007 y 2012. Los resultados de este trabajo establecieron que una distancia de entre 10-12 cambios nucleotídicos (SNP) es el umbral para definir casos de transmisión reciente, y que los pacientes con relaciones epidemiológicas claras, como los definidos por estudios de contactos, presentan diferencias de menos de 5 SNP, lo cual sugiere una transmisión mucho más reciente (Comas & Gil, 2016).

De manera similar, otro estudio sobre 12 aislamientos de *Kp*-KPC ST11, representativos de un brote hospitalario, mostró que, a pesar de presentar un patrón de EGCP similar que los clasificaba como estrechamente relacionados, estos aislamientos se dividieron en tres clados distintos al analizar las variaciones en el número de SNPs del genoma. Este hallazgo indicó que tres eventos de transmisión independientes contribuyeron a la amplia diseminación de los aislamientos implicados, subrayando el potencial de la secuenciación total del genoma para rastrear brotes hospitalarios de *Kp* (Jiang et al., 2015).

Nuestro equipo de investigación viene aplicando el método de cálculo de SNPs para evaluar la distancia evolutiva entre aislamientos clínicos de *Kp* KPC ST258 con patrones de EGCP similares y diferentes (García-Fulgueiras et al., 2020). Este enfoque ha permitido establecer distintos rangos de distancias entre SNPs para diversas situaciones epidemiológicas, ayudando a esclarecer las relaciones de transmisión en brotes hospitalarios.

## 7. Tratamientos de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* productoras carbapenemasa

Las infecciones causadas por *Kp* productoras de carbapenemasa (KPC) representan un desafío clínico significativo debido a su alta resistencia a múltiples antibióticos, incluidos los carbapenémicos, que tradicionalmente han sido el tratamiento de elección para infecciones graves por enterobacterias resistentes a  $\beta$ -lactámicos. Ante esta resistencia, se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas que combinan agentes antimicrobianos con diferentes mecanismos de acción para mejorar la eficacia del tratamiento.

Los regímenes terapéuticos actualmente utilizados incluyen combinaciones de antibióticos como colistina, tigeciclina, aminoglucósidos y fosfomicina. Sin embargo, la toxicidad de algunos de estos agentes y su eficacia limitada han llevado al desarrollo de nuevos antibióticos dirigidos contra cepas resistentes. Entre ellos, los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas como avibactam, relebactam

y vaborbactam han demostrado ser eficaces en combinación con cefalosporinas de espectro extendido (ceftazidima), y meropenem (Sophonsri et al., 2024).

Ceftazidima-avibactam ha emergido como una de las opciones más efectivas contra infecciones por KPC, especialmente en infecciones del torrente sanguíneo y neumonías asociadas a ventilación mecánica. Meropenem-vaborbactam y imipenem-relebactam también han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de infecciones complicadas del tracto urinario y bacteriemias. En casos de resistencia a estas combinaciones, el uso de cefiderocol, un nuevo antibiótico basado en el mecanismo de captación de hierro ha demostrado actividad contra cepas de *Kp* extremadamente resistentes (Sophonsri et al., 2024).

En el caso de infecciones causadas por *Kp* productora de NDM, el tratamiento representa un gran desafío terapéutico debido a que NDM no es inhibida por avibactam, relebactam ni vaborbactam. Sin embargo, una estrategia terapéutica prometedora es la utilización del Aztreonam o en caso de resistencia al mismo, usar la combinación de aztreonam con ceftazidima-avibactam, Aztreonam es un antibiótico monobactámico que no es hidrolizado por las metalo- $\beta$ -lactamasas como NDM. Sin embargo, muchas cepas productoras de NDM también presentan otras  $\beta$ -lactamasas, como BLEE y carbapenemasas tipo KPC, que pueden inactivar el aztreonam. Por otro lado, ceftazidima-avibactam es activo contra BLEEs y KPC, pero no contra NDM. La combinación de aztreonam con ceftazidima-avibactam permite superar esta barrera de resistencia, ya que ceftazidima-avibactam protege al aztreonam de la degradación por BLEEs y carbapenemasas tipo KPC, mientras que el aztreonam mantiene su actividad contra las metalo- $\beta$ -lactamasas como NDM (Tamma et al., 2024) (Taha et al., 2023).

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos antibióticos, en la práctica clínica siguen apareciendo cepas de *Kp* resistentes a las combinaciones terapéuticas disponibles. Entre ellas, se han identificado mutantes de KPC con resistencia a ceftazidima-avibactam, así como cepas productoras de NDM resistentes a la combinación de ceftazidima-avibactam con aztreonam (Satapoomin et al., 2022) (Simner et al., 2023). Asimismo, se han reportado aislamientos clínicos de *Kp* con resistencia a cefiderocol, lo que limita aún más las opciones terapéuticas (Huang et al., 2023).

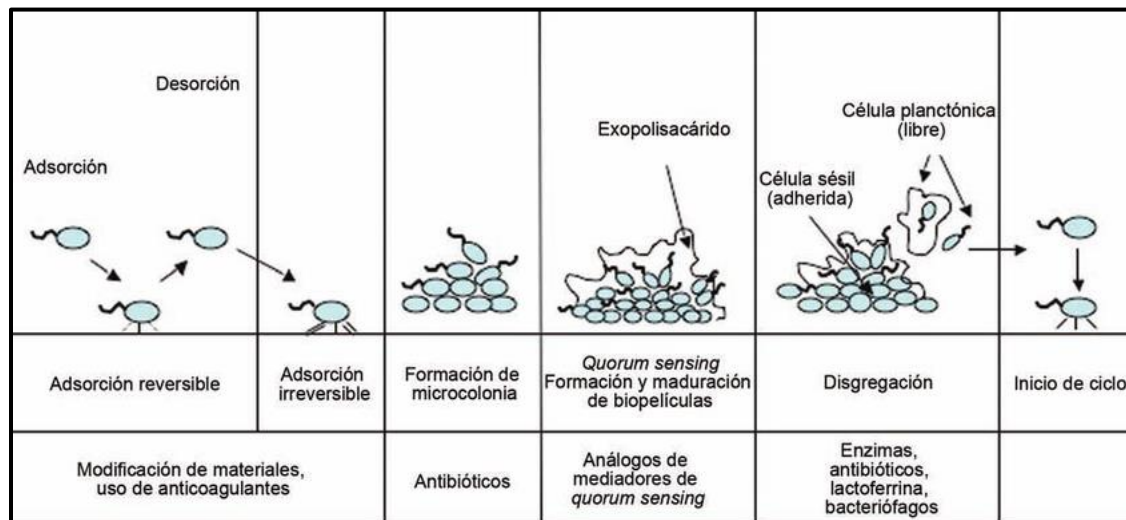
Ante este panorama, han surgido estrategias alternativas para el tratamiento de infecciones causadas por estas bacterias multirresistentes. Entre ellas se incluyen el uso de bacteriófagos, complejos metálicos, y nanopartículas de plata (Ag) y cobre (Cu), los cuales han demostrado

capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano y representan una posible solución terapéutica frente a infecciones causadas por aislamientos multirresistentes (Aranaga et al., 2022) (Hao et al., 2024).

## 8. Biofilm bacterianos

El tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a múltiples fármacos es un desafío, y la capacidad de los patógenos bacterianos para formar biofilms o biopelículas complica aún más este escenario. Tradicionalmente, los biofilms se han definido como una comunidad bacteriana organizada que se adhiere a superficies bióticas o abióticas y se encuentra embebida en una matriz extracelular de exopolisacáridos, proteínas, lípidos y ADN extracelular (de la Fuente-Núñez et al., 2013). Sin embargo, evidencias más recientes han demostrado que esta definición resulta limitada, ya que los biofilms no siempre requieren de una superficie para formarse (Hall-Stoodley et al., 2004). Diversos estudios han documentado la existencia de agregados celulares suspendidos en medios líquidos que comparten las características estructurales y funcionales de un biofilm, desafiando así la visión clásica (Kragh et al., 2016)(Kirketerp-Møller et al., 2020). En este contexto, se ha propuesto una nueva definición, que describe al biofilm como una comunidad microbiana estructurada, compuesta por células embebidas en una matriz extracelular autoproducida, que puede desarrollarse tanto adherida a superficies como en forma de agregados libres en suspensión (Sauer et al., 2022). Los biofilms proporcionan protección contra el sistema inmunológico del huésped y reduce significativamente la efectividad de los antibióticos, contribuyendo al desarrollo de infecciones crónicas y persistentes (Lanter et al., 2014). La formación del biofilm en *Kp* es un proceso dinámico que involucra varias etapas. Según el modelo convencional, inicialmente las bacterias se adhieren a una superficie mediante la expresión de estructuras especializadas como fimbrias tipo 1 y tipo 3 (Piperaki et al., 2017). Posteriormente, las bacterias inician la producción de una matriz extracelular compuesta principalmente por exopolisacáridos, entre los que destaca la cápsula de polisacáridos, un factor clave en la virulencia de esta especie (Flemming & Wingender, 2010). A medida que el biofilm madura, las bacterias dentro de la estructura experimentan cambios en su metabolismo y activan sistemas de comunicación intercelular basados en *quorum sensing* (QS), lo que permite la coordinación de la expresión génica y la adaptación al ambiente hostil. Finalmente, el biofilm se disgrega dando lugar al desprendimiento de células planctónicas que pueden comenzar un nuevo ciclo de formación de

biofilm (Castrillon & Ramos, 2010) (Figura 1). En *Kp* los factores que contribuyen a la formación de biofilm son entre otros, la capsula de polisacáridos, la presencia de fimbrias y pili, el LPS y el metabolismo del hierro (Guerra et al., 2022).



**Figura 1.** Etapas de formación de biofilm y estrategias de dispersión (Castrillon & Ramos, 2010).

Los pasos involucrados en la maduración del biofilm son regulados por moléculas de señal, también llamadas *quorum sensing* (QS) (Guilhen et al., 2019). El QS es un sistema sofisticado que se encarga de la comunicación entre células dentro de la comunidad del biofilm, mediante la producción, secreción y detección de pequeñas moléculas. Estas últimas son reconocidas por receptores bacterianos e inducen la expresión de ciertos genes alterando el fenotipo de la bacteria dando lugar a la maduración o disgregación del biofilm (Balestrino et al., 2005).

Una característica preocupante del biofilm es su capacidad para conferir una elevada resistencia a los antibióticos. La matriz extracelular actúa como una barrera física que limita la penetración de fármacos, mientras que las bacterias dentro del biofilm pueden entrar en un estado de latencia metabólica donde se ve favorecida la transferencia horizontal de genes, facilitando la diseminación de genes de resistencia a los antimicrobianos (Nirwati et al., 2019).

Además, la formación de biofilms representa un desafío clínico, especialmente en infecciones asociadas a dispositivos médicos como catéteres, ventiladores y prótesis ortopédicas. La persistencia de estas infecciones a menudo requiere la remoción quirúrgica del dispositivo afectado, ya que los tratamientos antibióticos convencionales son ineficaces para erradicar completamente la biopelícula (Malizos & Ioannou, 2014).

En respuesta a esta problemática, se están explorando nuevas estrategias terapéuticas, incluyendo el uso de complejos metálicos, nanopartículas metálicas, péptidos antimicrobianos, enzimas que degradan la matriz del biofilm, inhibidores de *quorum sensing* y terapia con bacteriófagos (Nadar et al., 2022) (Alisigwe et al., 2025).

## 9. Agentes antibiofilm

Las moléculas anti-biofilm comprenden diversos compuestos que inhiben la formación de biofilm. Los compuestos anti-biofilm identificados se aíslan principalmente de fuentes naturales, también se ha encontrado que algunos compuestos sintéticos, agentes quelantes y antibióticos, poseen actividad anti-biofilm (Ribeiro et al., 2016).

Estas moléculas intervienen en diferentes mecanismos para inhibir la formación de biofilm en diferentes bacterias como se detallan a continuación (Roy et al., 2018)(Olar et al., 2022a):

1. Dispersión de sustancias polisacáridas extracelulares de biofilm por enzimas
2. inhibición de N-acyl homo-serina lactonas mediada por quorum sensing
3. inhibición mediante desensamblado de biofilm
4. Neutralización de desensamblado de lipopolisacáridos
5. Clivaje de peptidoglicanos
6. Alteración del potencial de membrana o permeabilización de la membrana
7. Inhibición de la división y supervivencia celular
8. Inhibición de síntesis y de función de moléculas de adhesión
9. Inhibición de biofilm por polisacáridos

Varios antibióticos han sido estudiados para evaluar su potencial antibiofilm frente a diferentes bacterias (Ferreira et al., 2024) (González et al., 2017). La colistina ha sido estudiada como agente antibiofilm para el tratamiento de infecciones causadas por *Kp*, demostrando tener la capacidad a concentraciones sub-inhedoras de reducir considerablemente la formación de biopelículas (Lora-Tamayo et al., 2019) (Hošťacká & Čížnár, 2008) (Dosler et al., 2016). Sin embargo, se desconocen el o los mecanismos anti-biofilm mediado por el polipéptido colistina en aislamientos *Kp* productoras de carbapenemasa. En los últimos años, se ha estudiado la combinación de nanopartículas de plata con colistina como una estrategia para mejorar su efectividad contra biofilms y reducir su toxicidad (Jalil et al., 2024) (Şirin et al., 2023). Además de los antibióticos innumerables compuestos naturales y sintéticos se han evaluado para probar su potencial

antibiofilm en diversas especies bacterianas. Entre ellos los compuestos metálicos tiene un campo amplio de investigación y en muchos casos han resultado ser prometedores (Olar et al., 2022) (Pereira et al., 2023).

### 9.1 Complejos metálicos

Los complejos metálicos son estructuras químicas en las que los iones metálicos están coordinados con ligandos orgánicos o inorgánicos, lo que les confiere propiedades antibacterianas únicas. Entre los metales más utilizados se encuentran el cobre (Cu), la plata (Ag), el oro (Au) y el zinc (Zn) (Sharma et al., 2022) (Frei, 2020). Para su síntesis, el metal y el ligando se mezclan en solución acuosa o en solventes orgánicos bajo condiciones controladas de temperatura y pH que favorecen la formación del complejo (Nomiya et al., 2013). Los complejos metálicos ejercen su efecto antibacteriano mediante la alteración de la integridad de la pared celular, la inhibición de la replicación del ADN bacteriano y la generación de especies reactivas de oxígeno que provocan daño oxidativo irreversible en las células microbianas (Valko et al., 2005) (Gomes et al., 2020). Además, su versatilidad ha permitido su incorporación en recubrimientos antimicrobianos para dispositivos médicos, apósitos para heridas infectadas y formulaciones combinadas con antibióticos para potenciar su eficacia (J. Sahoo et al., 2022).

El uso de metales con propiedades antimicrobianas se remonta a la antigüedad, los egipcios utilizaban láminas de plata para tratar heridas, mientras que los romanos almacenaban agua y vino en recipientes de plata y cobre para evitar su contaminación. Estas aplicaciones empíricas sentaron las bases del uso de metales con fines médicos mucho antes del descubrimiento de los microorganismos (Alexander, 2009). A finales del siglo XIX y principios del XX, se usaron compuestos metálicos como el nitrato de plata para prevenir infecciones oculares en recién nacidos y el sulfato de cobre en el tratamiento de infecciones fúngicas y parasitarias (Frei et al., 2020). La plata es bien conocida por sus propiedades antimicrobianas de amplio espectro, debido a su capacidad para interactuar con las membranas celulares bacterianas, desestabilizarlas y generar especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que provoca estrés oxidativo y daño celular (Barras et al., 2018). Por su parte, el cobre también exhibe actividad antibacteriana a través de la generación de ROS, la alteración del metabolismo bacteriano y la interrupción de la homeostasis celular (Chandraleka et al., 2014).

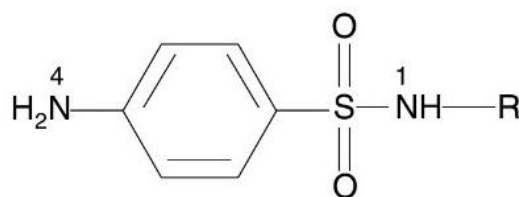
En el siglo XX, el descubrimiento de la penicilina y el desarrollo de los antibióticos convencionales desplazo el uso de los metales como antimicrobianos. Sin embargo, la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos ha resurgido el interés en los metales como alternativas terapéuticas (Evans & Kavanagh, 2021). El uso de complejos metálicos como agentes antibiofilm está siendo objeto de estudio en la actualidad, como recurso adicional en las infecciones causadas por microorganismos difíciles de tratar (Abd El-Hamid et al., 2020) (Bi et al., 2021).

Si bien los complejos metálicos tienen un gran potencial antibacteriano, su seguridad en aplicaciones clínicas es un aspecto crucial. La plata y el cobre han demostrado ser seguros en dosis controladas, sin embargo, su administración en concentraciones elevadas puede generar efectos adversos como estrés oxidativo, alteraciones en la homeostasis celular y, en el caso de la plata, la acumulación tisular que conduce a argiria. Las dosis seguras varían según la vía de administración; en tratamientos tópicos, las concentraciones suelen oscilar entre 10 y 50 ppm para la plata y entre 1 y 10 mM para el cobre, mientras que en aplicaciones sistémicas se han reportado niveles tolerables de hasta 0.5 mg/kg para la plata y 0.1 mg/kg para el cobre.

## 9.2 Sulfonamidas metálicas

Las sulfonamidas son una de las clases más antiguas de antibióticos sintéticos, utilizadas ampliamente debido a su capacidad para inhibir la síntesis de ácido fólico en bacterias, un proceso esencial para su crecimiento y replicación. Sin embargo, el desarrollo de resistencia bacteriana ha limitado su eficacia clínica, lo que ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias para mejorar su actividad (Sköld, 2000).

La síntesis de complejos metálicos de sulfonamidas con Ag y Cu generalmente implica la formación de enlaces de coordinación entre el ion metálico y los grupos funcionales de la sulfonamida, como el nitrógeno de la amida o el oxígeno del grupo sulfonilo (figura 2) (Hangan et al., 2016). Estos complejos pueden prepararse mediante métodos de síntesis en solución, utilizando sales metálicas como nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) o sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) en condiciones controladas de pH y temperatura (Danish et al., 2021).



**Figura 2.** Estructura general de las sulfonamidas.

Los complejos metálicos de sulfonamidas con plata y cobre han demostrado un efecto sinérgico que mejora la capacidad antibacteriana de estos compuestos. Por ejemplo, Ag-sulfadiazina ha demostrado actividad antimicrobiana más alta que sus ligandos libres (Carr et al., 1973). En la actualidad se utiliza la sulfadiazina de plata como cremas para tratar las quemaduras de segundo y tercer grado (Sosa & Caunegre, 2018).

No se han reportado estudios que investiguen la capacidad antibiofilm de estos complejos metálicos en *Kp*. Sin embargo, un estudio evaluó la capacidad antibiofilm de varias sulfonamidas metálicas en el que se observó que derivados sulfadiazina y sulfametoxazol con oro fueron capaces de inhibir la formación de biofilm en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (Mizdal et al., 2018). Por otro lado, varios estudios han demostrado la capacidad de algunas sulfonamidas metálicas para inhibir el biofilm de diferentes géneros bacterianos (Bonez et al., 2021)(Siqueira et al., 2023).

Por su lado, las nanopartículas metálicas, especialmente aquellas basadas en plata y cobre, representan otra estrategia eficaz contra la resistencia a los antibióticos y a los microorganismos formadores de biofilm (González Rojas, 2013) (Robino & Scavone, 2020). Las nanopartículas son materiales cuyo tamaño oscila entre 1 y 100 nanómetros. Debido a su reducido tamaño, poseen una alta relación superficie-volumen, lo que les confiere propiedades fisicoquímicas únicas en comparación con los mismos materiales en su forma macroscópica. Gracias a su alta relación superficie-volumen, estas estructuras permiten una mayor interacción con las células bacterianas, lo que potencia su efecto antimicrobiano (Huamán et al., 2024).

### 9.3 Polioles metálicos

Los polioles metálicos, compuestos formados por la complejación de metales con polioles derivados de azúcares, han cobrado interés en la búsqueda de nuevas estrategias antibacterianas. Los polioles que más se utilizan para complejarse con metales son los alditoles, también llamados azúcares alcohólicos, debido a que estos son agentes quelantes eficientes de iones metálicos (Allscher et al., 2007). Los alditoles como el sorbitol, el manitol y el xilitol, poseen múltiples grupos hidroxilo (-OH) que les permiten actuar como ligandos naturales para cationes metálicos, como la Ag (I), el Cu (II) y el Zn (II). La formación de estos complejos no solo estabiliza los metales en solución, sino que también modula su biodisponibilidad y actividad biológica (Cotton & Wilkinson, 1996).

Los polioles metálicos han demostrado actividad antibacteriana mediante múltiples mecanismos. En primer lugar, la interacción de estos complejos con la pared y membrana celular bacteriana provoca una alteración estructural que compromete la integridad celular. Además, los iones metálicos liberados pueden interrumpir procesos metabólicos esenciales al interferir con proteínas enzimáticas y generar estrés oxidativo a través de ROS (Valko et al., 2005). Este efecto es particularmente relevante en bacterias resistentes a antibióticos, donde el estrés oxidativo puede debilitar las defensas del microorganismo y potenciar la acción de otros agentes antimicrobianos. Además de su efecto bactericida, los polioles metálicos han mostrado actividad anti-biofilm, inhibiendo la formación y maduración de biopelículas bacterianas (Lim et al., 2018). Se ha observado que estos compuestos interfieren con la adhesión bacteriana y la producción de la matriz extracelular, reduciendo significativamente la persistencia de infecciones crónicas asociadas a biopelículas (Libardo et al., 2017).

El xilitol se encuentra en plantas, hongos y algas. Es un azúcar de gran interés farmacéutico por sus aplicaciones como edulcorante y agente antimicrobiano en preparaciones farmacéuticas (Shafer et al., 1987). Una gran cantidad de microorganismos no puede utilizar el xilitol como fuente de carbono, y su presencia ejerce un efecto tóxico actuando como antimicrobiano (ASSEV et al., 1983). Se ha visto que el xilitol afecta la síntesis de polisacáridos disminuyendo la adherencia de ciertas bacterias como *S. mutans*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. (Tapiainen, 2002) (Decker et al., 2008). Por otro lado, el xilitol se utiliza en terapia combinada para alterar la estructura del biofilm de *P. aeruginosa* en heridas crónicas (Ammons et al., 2009).

# Objetivos

## Objetivo general

Estudiar la epidemiología de la resistencia en *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa de origen clínico y evaluar alternativas potenciales para el tratamiento de infecciones causadas por estas bacterias.

## Objetivos específicos

1. Caracterizar genéticamente los aislamientos.
2. Correlacionar el perfil de resistencia con el genotipo de resistencia
3. Analizar la relación genética entre los aislamientos
4. Analizar las plataformas genéticas plasmídicas
5. Evaluar la producción de biofilm de los aislamientos estudiados
6. Evaluar compuestos en su capacidad de inhibir y/o erradicar el biofilm de *Klebsiella pneumoniae*.

## Estrategia de investigación

En este trabajo de tesis se estudiaron dos grupos de aislamientos clínicos de *Kp* multirresistente productoras de carbapenemasa provenientes de distintos centros asistenciales de Montevideo. Por un lado, se seleccionaron dos aislamientos que formaron parte de un brote de *Kp* productora de KPC ocurrido en 2011. Este brote involucró a cuatro pacientes y recopiló un total de 16 aislamientos, los cuales fueron previamente estudiados por el grupo de trabajo en el marco de la maestría de la Magister B.C. Florencia Geymonat. Los dos aislamientos seleccionados tienen la particularidad de ser coaislamientos (obtenidos simultáneamente a partir del cultivo de la herida operatoria de un paciente trasplantado), presentando morfotipos de colonia diferentes (colonia grande y colonia chica) y distintos patrones de resistencia a cefalosporinas y carbapenems. En el trabajo de maestría de Florencia Geymonat se realizó la electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE), obteniéndose como resultado que estos aislamientos presentan una diferencia de dos bandas. Usando el criterio interpretativo de Tenover (Tenover et al., 1995), se puede afirmar que estos aislamientos están muy relacionados y pertenecen a la misma clona. Sin embargo, el criterio de Tenover establece que una diferencia de dos a tres bandas puede explicarse por la ocurrencia de un evento genético (mutación puntual, inserción o delección) cuando el aislamiento se cultiva repetidamente a lo largo del tiempo o se aísla varias veces de un mismo paciente. Dado que estos aislamientos se obtuvieron del mismo cultivo a tiempo cero, el criterio de Tenover no estaría incluyendo estos aislamientos. Por lo tanto, en este trabajo se propone desafiar la electroforesis en gel de campo pulsante con un método más sensible: el análisis del número de polimorfismos de nucleótido único (SNP) del genoma *core*.

Por otro lado, se trabajó también con cinco aislamientos de *Kp* multirresistentes productoras de NDM y resistentes a la colistina, obtenidos durante 2023 de dos centros asistenciales de Montevideo. Estos aislamientos más recientes presentan un secuenciotipo distinto (ST307), el cual no había sido reportado previamente en el país. Además, su perfil de resistencia refleja un cambio en la epidemiología de *Kp* en Uruguay, dado que antes del 2016 la carbapenemasa predominante en los aislamientos clínicos era KPC, mientras que en los últimos años se ha observado un aumento en la frecuencia de productoras de NDM y una disminución de KPC (Ministerio de Salud Pública., 2024).

En este contexto, la presente tesis busca no solo caracterizar estos nuevos aislamientos, sino también compararlos con los aislados previamente estudiados, con el fin de evaluar la evolución de la resistencia a carbapenémicos en el país. A través del análisis genético y fenotípico, se pretende determinar si existen tendencias en la adquisición y propagación de determinantes de resistencia, así como explorar posibles mecanismos compartidos entre ambos grupos de aislamientos que puedan haber contribuido a su diseminación en el ámbito hospitalario.

En esta tesis también se evaluó la capacidad de varios compuestos químicos para inhibir o erradicar el biofilm de *Kp* multirresistente. Los compuestos ensayados fueron la colistina y una variedad de complejos metálicos sintetizados y caracterizados por la cátedra de inorgánica de la Facultad de Química.

## Materiales y métodos

### Aislamientos estudiados

Se analizaron 7 aislamientos clínicos de *Kp* productora de carbapenemasa obtenidas de 3 centros asistenciales de Montevideo. Los aislamientos 54-1 y 54-2 pertenecieron a un brote infeccioso de *Kp*-KPC el cual tuvo lugar entre 12/9/2011 y 31/10/2011. Por otro lado 5 aislamientos de *Kp* fueron recopilados durante junio y mayo del 2023 de otros dos centros asistenciales de Montevideo en el marco de la vigilancia epidemiológica de emergencia de resistencia a antibióticos llevada a cabo por el grupo de trabajo. Este segundo grupo de aislamiento comprende 5 *Kp* productoras de carbapenemasa tipo NDM y resistentes a colistina (Tabla 1).

Los datos de procedencia, fechas de obtención, identificación y susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos fueron proporcionados por los centros asistenciales. La identificación y el antibiograma se determinaron por el sistema automatizado Vitek-2 (BioMérieux) con las tarjetas GN para identificación y las tarjetas AST-N082, AST-N402 y AST-N422 para el ensayo de sensibilidad a los antibióticos. La interpretación de los resultados se realizó siguiendo los criterios establecidos en la norma *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M100, 2025 (Clinical and Laboratory Standards Institute., 2025), a excepción de tigeciclina que fue interpretado siguiendo las recomendaciones establecidas por el *Epidemiological cut-off value* (ECOFF) ( $\text{CIM} \leq 2 \mu\text{g/mL}$  ausencia de mecanismos de resistencia) [https://www.eucast.org/mic\\_and\\_zone\\_distributions\\_and\\_ecoffs/new\\_and\\_revised\\_ecoffs](https://www.eucast.org/mic_and_zone_distributions_and_ecoffs/new_and_revised_ecoffs). Los aislamientos 54-1 y 54-2 fueron evaluados en la producción de carbapenemasas mediante ensayo de sinergia con disco de carbapenem, ácido fenilborónico y EDTA, y posteriormente mediante PCR para detección molecular. En los aislamientos recopilados durante el 2023, los ensayos de sensibilidad se complementaron con ensayos de inmunocromatografía para la detección del tipo de carbapenemasa (Coris Resisit-5 O.K.N.V.I. (CorisBioconcept SPRL, Belgium)), para la evaluación de la producción de BLEE se realizó ensayo de sinergia de doble disco propuesta por Gao *et al.* (Gao *et al.*, 2015) y siguiendo los procedimientos establecidos por CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute., 2023).

**Tabla 1.** Aislamientos estudiados

| Aislamiento | Fecha obtención | Sitio de infección | SAM      | PTZ      | KZ       | CRO      | CAZ      | FEP      | ATM      | IMP      | MEM      | AK       | GE       | CIP      | SXT      | TYG      | COL      | BLEE | C     | CLF |
|-------------|-----------------|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------|-------|-----|
|             |                 |                    | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat | CIM /cat |      |       |     |
| 54-1        | 14/9/2011       | HO                 | ≥32 /R   | ≥128 /R  | ≥64 /R   | 4 /R     | 8 /I     | 2 /S     | S/D      | 4 /R     | 1 /S     | 4 /S     | ≥32 /R   | ≥4 /R    | ≥320 /R  | S/D      | S/D      | +    | KPC-2 | MDR |
| 54-2        | 14/9/2011       | HO                 | ≥32 /R   | ≥128 /R  | ≥64 /R   | ≥64 /R   | ≥64 /R   | 4 /SDD   | S/D      | 4 /R     | 1 /S     | ≤2 /S    | ≥32 /R   | ≥4 /R    | ≥320 /R  | S/D      | S/D      | +    | KPC-2 | MDR |
| Kp16        | 9/5/2023        | Sangre             | ≥32 /R   | ≥128 /R  | ≥64 /R   | ≥64 /R   | ≥64 /R   | ≥32 /R   | ≤1 /S    | ≥16 /R   | ≥16 /R   | 32 /R    | ≥16 /R   | ≥4 /R    | ≥320 /R  | 2 /WT    | ≥4 /R    | -    | NDM   | MDR |
| Kp20        | 13/6/2023       | Orina              | ≥32 /R   | ≥128 /R  | ≥64 /R   | ≥64 /R   | ≥64 /R   | ≥32 /R   | S*       | ≥16 /R   | ≥16 /R   | 32 /R    | ≥16 /R   | ≥4 /R    | ≥320 /R  | 2 /WT    | ≥4 /R    | -    | NDM   | MDR |
| Kp21        | 8/5/2023        | Hueso              | ≥32 /R   | ≥128 /R  | ≥64 /R   | ≥64 /R   | ≥64 /R   | 4 /SDD   | S*       | 8 /R     | 8 /R     | 32 /R    | ≥16 /R   | ≥4 /R    | ≥320 /R  | ≤0,5 /WT | ≥4 /R    | -    | NDM   | MDR |
| Kp22        | 12/6/2023       | ST                 | ≥32 /R   | ≥128 /R  | ≥64 /R   | ≥64 /R   | ≥64 /R   | ≥32 /R   | S*       | ≥16 /R   | ≥16 /R   | 32 /R    | ≥16 /R   | ≥4 /R    | ≥320 /R  | 2 /WT    | ≥4 /R    | -    | NDM   | MDR |
| Kp23        | 24/6/2023       | Orina              | ≥32 /R   | ≥128 /R  | ≥64 /R   | ≥64 /R   | ≥64 /R   | ≥32 /R   | ≥64 /R   | ≥16 /R   | ≥16 /R   | 32 /R    | ≥16 /R   | ≥4 /R    | ≥320 /R  | 4 /MR    | ≥4 /R    | +    | NDM   | PDR |

Aclaraciones: Los datos de sensibilidad a los antibióticos que figuran en la tabla fueron aportados por el servicio asistencial donde se aislaron por primera vez y obtenidos por el sistema automatizado Vitek-2. HO: herida operatoria, ST: secreción traqueal, SAM: Ampicilina/Sulbactam, PTZ: Piperacilina/Tazobactam, KZ: Cefazolina, CRO: Ceftriaxona, CAZ: Ceftazidime, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, AK: Amicacina, GE: Gentamicina, CIP: Ciprofloxacina, STX: Trimetoprima/Sulfametoxazol, TYG: Tigeciclina, COL: Colistina, BLEE: β-lactamasa de espectro extendido, C: carbapenemasa, CLF: clasificación, CIM: concentración inhibitoria mínima en mg/L, Cat: categoría según CLSI M100 ED35:2025, S: sensible, I: intermedio, R: resistente, SDD: sensible dosis dependiente, WT: tipo salvaje, MR: con mecanismo de resistencia, S/D: sin dato, \*: obtenido por el método de disco difusión. La producción de carbapenemasa se sospechó por la resistencia a los carbapenems y se confirmó por ensayo inmunocromatográfico CORIS Resisit-5 O.K.N.V.I. (CorisBioconcept SPRL, Belgium) realizado en el laboratorio de bacteriología del servicio asistencial. La producción de BLEE fue evaluada mediante ensayo de sinergia.

## Estudio de los antibiotipos

Para el estudio de los antibiotipos se tomaron en cuenta los resultados de CIM a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, los aminoglucósidos y la ciprofloxacina, así como la susceptibilidad al aztreonam. Las demás familias de antibióticos no se tuvieron en cuenta ya que los resultados no mostraron variabilidad entre los aislamientos. Teniendo en cuenta las CIM de los antibióticos en estudio se agruparon los aislamientos en distintos antibiotipos, considerando que la reproducibilidad del sistema es de  $\pm 1$  dilución. Los aislamientos fueron adicionalmente clasificados en multidrogarresistentes (MDR), extensamente resistentes (XDR) y panresistentes (PDR). Siendo los aislamientos MDR aquellos que muestran resistencia a, al menos, un agente en tres o más categorías de antimicrobianos diferentes. Los aislamientos extensamente resistentes XDR aquellos que son resistentes a, al menos, un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto en uno a dos; y los aislamientos PDR aquellos que son resistentes a todos los agentes antimicrobianos en todas las categorías (Magiorakos et al., 2012). Teniendo en cuenta la clasificación en antibiotipos se seleccionaron representantes de cada grupo para secuenciar su genoma total. Los genomas seleccionados para secuenciar fueron 54-1, 54-2, Kp20, Kp21 y Kp23.

### 1. Caracterización genética de los aislamientos.

#### 1.1 Extracción de ADN y determinación de su calidad

La extracción de ADN total de los aislamientos seleccionados para secuenciación de genomas completos se realizó mediante el uso del kit comercial Quick-DNA<sup>TM</sup> Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research), siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de un cultivo puro se prepara una suspensión equivalente a 3 McFarland, se agrega el buffer de lisis y se emplea vortex durante 20 min para agitar las muestras vigorosamente. Las células bacterianas son lisadas mediante la combinación de agentes químicos y un tratamiento mecánico empleando perlas (bead beating). Este tratamiento rompe las paredes celulares y las membranas, liberando el contenido intracelular. Luego los componentes no deseados, como proteínas y otros contaminantes, son precipitados y separados del ADN mediante una serie de centrifugaciones (1min, 10.000 rpm) y el uso de soluciones de precipitación y lavado. El ADN liberado se une a una columna de sílica en presencia de una solución de unión y las impurezas son removidas mediante lavados

adicionales. Finalmente, el ADN purificado es eluido de la columna de sílica utilizando una solución de elución. El ADN fue eluido en 60 uL de buffer de elución.

Una vez obtenido el ADN, se procedió a la determinación de su concentración y evaluación de su pureza mediante relación de absorbancias a 260 y 280 nm. La concentración de ADN y la relación A260/A280 fueron obtenidas empleando el Nanodrop 1000, considerándose suficientemente puras aquellas muestras con una relación  $> 1.8$ . Además, se evaluó la integridad del ADN usando electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

Luego de contar con ADN de buena calidad ( $A_{260}/A_{280} > 1.8$ ) y cantidad (60  $\mu\text{L}$  a una concentración  $> 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ), se procedió al envío del ADN para su secuenciación. Los ADN fueron secuenciados mediante dos técnicas, los reads cortos se obtuvieron usando Illumina NovaSeq 6000 con el uso de librerías de Nextera XT que generan lecturas de 150bp, realizado por la empresa Novogene. Los reads largos fueron obtenidos usando la metodología de Oxford Nanopore Technologies (ONT), realizado por el grupo de trabajo del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química. Las bibliotecas se prepararon utilizando el Rapid Barcoding Kit 24 V14 (SQK-RBK114.24) adquirido de ONT (Oxford, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit permite la escisión simultánea de los cebadores y la unión de etiquetas de códigos de barras a los extremos escindidos utilizando un método basado en transposones sin PCR. Las bibliotecas se cargaron en la plataforma MinION utilizando una celda de flujo R10.4.1, y los datos brutos obtenidos se procesaron utilizando el software ONT-Guppy v6.1.7. Este software se empleó para la demultiplexación y el base calling de las lecturas, permitiendo la obtención de los archivos de lectura (reads).

## 1.2 Ensamblaje y anotación de los genomas

### 1.2.1 Análisis de calidad de las lecturas

Los archivos generados en la secuenciación de Illumina y Nanopore incluyen los archivos de lectura (Reads) que son aquellos con extensión “.fastq”. Este formato de archivo constituye el input estándar crudo reconocido por los programas bioinformáticos habituales para el procesamiento de datos. Para evaluar la calidad de las lecturas de Illumina, se utilizó el software FastQC desarrollado por el Babraham Institute

(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). FastQC es una herramienta de control de calidad que permite realizar un análisis de los datos de secuenciación y detectar problemas que afectan la calidad de las lecturas. FastQC realiza una serie de análisis automáticos sobre los datos cargados, generando diversos gráficos y estadísticas que describen diferentes aspectos de la calidad de las lecturas. Los análisis incluyen la calidad por base, el contenido de GC, presencia de adaptadores, longitud de las lecturas, duplicación de secuencias, entre otros. Cada parámetro es representado mediante un código de colores que distingue calidades buenas, regular o mala.

### 1.2.2 Ensamblaje de *novo*

El ensamblaje de *novo* de los genomas obtenido por Illumina se realizó mediante el software SPAdes 3.11.1 (<https://github.com/ablab/spades>). SPAdes emplea un enfoque basado en gráficos de Bruijn y un algoritmo de ensamblaje iterativo. Este método divide las secuencias en pequeños fragmentos llamados "k-mers" y construye un gráfico de Bruijn para ensamblar estos fragmentos en secuencias contiguas (contigs). SPAdes realiza múltiples iteraciones ajustando el tamaño de los k-mers para mejorar la precisión del ensamblaje. Al finalizar el ensamblaje, SPAdes genera un conjunto de contigs que representan el genoma ensamblado de la muestra (Bankevich et al., 2012). Los k-mers empleados fueron 21, 33, 55, 77, 99 y 127.

El ensamblaje de *novo* de los genomas obtenido por Nanopore se realizó utilizando el programa Flye v2.9.4 (<https://github.com/mikolmogorov/Flye>). Para generar el ensamblado Flye comienza construyendo un gráfico de Bruijn a partir de las lecturas largas, seguido de una fase de ensamblaje inicial que agrupa las lecturas en contigs preliminares. Luego, refina estos contigs mediante un proceso iterativo de corrección y extensión, aprovechando las largas lecturas para cerrar brechas y resolver regiones repetitivas. Al finalizar el proceso de ensamblaje, Flye genera un conjunto de contigs que representan el genoma ensamblado de la muestra (Kolmogorov et al., 2019).

### 1.2.3 Evaluación de la calidad del genoma ensamblado

La evaluación de la calidad de los genomas ensamblados por SPAdes se realizó mediante el software Quast v5.2.0 (<http://quast.sourceforge.net/quast>). Este programa compara los ensamblajes con una referencia, cuando está disponible, y genera un conjunto de métricas que

describen la calidad del ensamblaje. Entre estas métricas se incluyen la longitud total del ensamblaje, el número y tamaño de los contigs, el valor N50 (tamaño del contig más pequeño para cubrir el 50% del genoma, habiendo ordenado los contigs de mayor a menor tamaño), el valor L50 (número de contigs necesarios para cubrir el 50% del genoma), la cantidad de regiones no ensambladas, y la precisión de las secuencias ensambladas en comparación con la referencia. QUAST también identifica posibles errores y áreas de baja calidad en los ensamblajes. Al finalizar el análisis, QUAST genera un informe detallado con gráficos y tablas que resumen las métricas de calidad (Mikheenko et al., 2018)

La evaluación de la calidad de los genomas obtenidos por Flye se hizo utilizando el programa BUSCO ([https://busco.ezlab.org/busco\\_userguide.html](https://busco.ezlab.org/busco_userguide.html)). BUSCO v3.4.2 es una herramienta que permite evaluar la integridad y la completitud de los ensamblajes genómicos mediante la búsqueda de genes ortólogos universales conservados. Este programa compara los ensamblajes con una base de datos de ortólogos específicos de un linaje particular, proporcionando métricas que describen la calidad del ensamblaje. BUSCO identifica y clasifica los genes ortólogos en cuatro categorías: completos únicos, completos duplicados, fragmentados y ausentes. Este análisis permite determinar la proporción de genes completos presentes en el ensamblaje, como indicador de la calidad y la integridad del genoma ensamblado (Simão et al., 2015)

#### 1.2.4 Obtención de los pulidos de Nanopore con Illumina

Para generar un ensamblaje de alta calidad, se combinaron los genomas obtenidos por Illumina y Nanopore mediante un proceso de pulido. Inicialmente, se utilizó el software Medaka (<https://github.com/nanoporetech/medaka>) para pulir los ensamblajes de Nanopore. Medaka es una herramienta diseñada específicamente para corregir errores en los ensamblajes de secuencias largas utilizando modelos de redes neuronales. Se cargan los ensamblajes obtenidos con Flye en Medaka junto con las lecturas de Nanopore para corregir los errores y mejorar la precisión del ensamblaje inicial (Oxford Nanopore Technologies, 2020)

Posteriormente, las lecturas de Illumina se limpiaron utilizando FastP, una herramienta rápida y eficiente para el preprocesamiento de secuencias de alta calidad. Este paso incluyó la eliminación de secuencias adaptadoras y la corrección de errores en las lecturas cortas, asegurando que las

lecturas de Illumina estuvieran libres de contaminantes y listas para el mapeo (S. Chen et al., 2018).

Luego, las lecturas limpias de Illumina fueron mapeadas con el ensamblaje pulido de Flye utilizando las herramientas SAMtools y bowtie2 generando los archivos de extensión .sam. Este mapeo permite alinear las lecturas de alta precisión de Illumina con el ensamblaje de Nanopore (Li et al., 2009) (Langmead & Salzberg, 2012).

Finalmente, se utilizó Polypolish para realizar un pulido adicional del ensamblaje de Flye-Medaka utilizando las lecturas de Illumina mapeadas. Polypolish es una herramienta que refina aún más los ensamblajes corrigiendo errores remanentes, aprovechando la alta precisión de las lecturas de Illumina. Al finalizar se obtiene un ensamblaje híbrido de alta calidad, combinando la longitud y continuidad de las lecturas de Nanopore con la precisión de las lecturas de Illumina (Wick & Holt, 2022).

#### 1.2.5 Anotación de los genomas

Para la anotación de los genomas ensamblados, se utilizaron los programas Prokka v1.13.3 (Rapid Prokaryotic Genome Annotation) (<https://github.com/tseemann/prokka>) y RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>). Prokka es una herramienta ampliamente utilizada para la rápida anotación de genomas procariotas, proporcionando predicciones de genes, ARN ribosomales y ARN de transferencia, además de identificar diversas características genómicas. RAST es otra herramienta robusta para la anotación de genomas bacterianos, que ofrece un análisis exhaustivo mediante la comparación de las secuencias genómicas con bases de datos de referencia, identificando genes y asignando funciones basadas en subsistemas metabólicos conocidos (Seemann, 2014) (Aziz et al., 2008)

#### 1.3 Análisis genómico

El análisis genómico se basó en la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos, grupos de incompatibilidad plasmídica, genes de virulencia, genes capsulares y genes MLST. Se utilizó la base de datos RestFinder (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>) para la búsqueda de genes de resistencia y de mutaciones puntuales involucradas en resistencia a antibióticos. Para la identificación de los plásmidos presentes en los aislamientos, se empleó la herramienta

bioinformática PlasmidFinder (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>), la cual permite detectar replicones plasmídicos, identificando los grupos de incompatibilidad (Inc) a los que pertenecen los plásmidos. La base de datos específica de *Kp* del *Institut Pasteur* de París Bigsdb (<https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/>) se utilizó para la búsqueda de genes virulencia y de patogenicidad, así como también para el análisis de genes involucrado en la síntesis de la cápsula (*wzi* y obtención del Klocus). Además, la búsqueda de genes de virulencia se complementó con la base de datos Kleborate del Pathogenwatch (<https://cgps.gitbook.io/pathogenwatch/technical-descriptions/typing-methods/kleborate>) y con la base de datos de virulencia VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>). Los aislamientos fueron clasificados según la técnica de tipificación genética *Multilocus Sequence Typing* (MLST), que se basa en la secuenciación de varios genes esenciales o *housekeeping* que están presentes en todas las cepas de una misma especie. Para la determinación del MLST se utilizó la base de datos del Bigsdb. Los aislamientos que no fueron seleccionados para secuenciación fueron sometidos a PCR y posterior secuenciación para la búsqueda de los genes *mcr*, carbapenemasa y los 7 genes para MLST, utilizando primers específicos (ver Anexo I).

## 2. Correlación del perfil de resistencia con el genotipo de resistencia

Para correlacionar el perfil de resistencia con el genotipo de resistencia se analizó el fenotipo de resistencia y se trató de explicar la resistencia encontrada a los antibióticos con genes de resistencia encontrados en base de datos, y con alteraciones en genes cromosomales que tuvieran relación conocida con resistencia a antibióticos (mutaciones puntuales, deleciones, inserciones o ausencia del gen).

La resistencia a colistina fue analizada buscando el gen plasmídico *mcr* y los genes cromosomales relacionados con la resistencia a la misma: *mcrB*, *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB* y *crpB*.

Los genes de  $\beta$ -lactamasa y sus variantes se evaluaron mediante el uso de la base de datos específica Beta-Lactamase Data Base (Naas et al., 2017).

El análisis *in silico* de las interrupciones o alteraciones en los loci cromosómicos se realizó utilizando la herramienta de búsqueda local básica de nucleótidos (BLASTn) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), alineando los genomas ensamblados contra la secuencia del gen tipo salvaje de *Kp* 30684/NJST258\_2 (número

de acceso en GenBank: CP006923). Los cambios a nivel de proteína fueron analizados utilizando la herramienta NCBI BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 3. Análisis de la relación genética entre los aislamientos

#### 3.1 Análisis del pangenoma

El pangenoma bacteriano representa la totalidad de genes presentes dentro de un grupo de bacterias de la misma especie. Este concepto incluye tanto los genes conservados en todos los miembros de la especie, conocidos como el genoma núcleo, como los genes que son variables y específicos de algunos miembros, conocidos como el genoma accesorio. Para analizar el pangenoma de los aislamientos en estudio, se utilizó el software Roary v3.13.0 (<https://www.sanger.ac.uk/science/tools/roary>), una herramienta especializada en la creación de pangenomas de bacterias a partir de datos de anotaciones de múltiples genomas. Este programa emplea los archivos con extensión .gff obtenidos por Prokka, y compara todos los genomas que se le suministren dando como outputs gráficos y tablas resultantes de la comparativa, tales como presencia/ausencia de genes, entre otros (Page et al., 2015)

#### 3.2 Extracción de SNPs del genoma núcleo

El genoma núcleo, genoma central o *core genome*, es el conjunto de genes que son conservados en todas las cepas de una especie bacteriana determinada. Para identificar y analizar las variantes genéticas presentes en el genoma núcleo de los aislamientos bacterianos estudiados, se realizó la extracción de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) utilizando el programa SNP-sites (<https://www.sanger.ac.uk/tool/snp-sites/>). Los SNPs son variaciones en un solo nucleótido que ocurren en una posición específica del genoma y representan una de las formas más comunes de variación genética entre individuos de la misma especie. SNP-sites es una herramienta diseñada para identificar y reportar SNPs a partir de alineamientos de secuencias múltiples. Para obtener las posiciones de los SNPs con SNP-sites se utilizó el alineamiento de los genes que comprenden el genoma núcleo obtenido por Roary (core\_genome\_snps\_align core\_gene\_alignment.aln)

### 3.3 Análisis filogenético

El análisis filogenético se basó en la construcción de un árbol filogenético basado en las diferencias de SNPs del genoma *core*. Para la construcción del árbol se utilizó el software FastTree v2.1.11 (<http://www.microbesonline.org/fasttree/>), que permite generar árboles filogenéticos basados en el método de máxima verosimilitud. Este software calcula las relaciones filogenéticas entre las secuencias utilizando el archivo `core_genome_snps_align.snp_sites.aln` obtenido por SNP-site y devuelve el archivo con extensión `.nwk` que contiene la representación del árbol filogenético en formato texto. Para visualizar el árbol se usó el programa MEGA v8.0 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Price et al., 2010) (Kumar et al., 2018). Para comparar la deferencia en el número de SNPs se construyó una matriz utilizando el output de SNP-site con extensión `.vcf`.

### 4. Análisis de las plataformas genéticas plasmídicas

Las secuencias plasmídicas fueron comparadas utilizando los programas BRIG (BLAST Ring Image Generator) (<https://sourceforge.net/projects/brig/>) y Artemis Comparison Tool (ACT) (<https://sanger-pathogens.github.io/Artemis/ACT/>). BRIG fue empleado para generar imágenes circulares comparativas de las secuencias plasmídicas. Este software permite la visualización de alineamientos de secuencias múltiples en un formato gráfico intuitivo, facilitando la identificación de regiones conservadas y divergentes entre diferentes plásmidos. Por otro lado, Artemis Comparison Tool se utilizó para realizar comparaciones detalladas entre secuencias plasmídicas mediante la generación de gráficos de alineamiento basados en BLAST. Esta herramienta permite explorar y analizar alineamientos de secuencias de manera interactiva, proporcionando funcionalidades avanzadas para la anotación y visualización de datos genómicos (Alikhan et al., 2011) (Carver et al., 2005). Además, también se utilizó la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar las secuencias plasmídicas mediante los valores de porcentaje de identidad y cobertura. Para la representación y visualización de regiones específicas de las secuencias plasmídicas se utilizó el programa Easyfig (<https://mjsull.github.io/Easyfig/>).

## 5. Complejos metálicos y colistina

Los compuestos que fueron evaluado en su capacidad de inhibir y/o erradicar el biofilm fueron, por un lado, complejos metálicos sintetizados y caracterizados por la catedral de inorgánica de la Facultad de Química, dentro de los cuales se incluyeron 9 sulfonamidas heterocíclicas acomplejados con Cu o Ag y 7 compuestos polioles acomplejados con Cu, Zn, Co o Ni. Por otro lado, también se incluyó el polipéptido colistina, en el cual se evaluaron cepas de *Kp* sensibles y resistentes a colistina. Los compuestos y sus características se muestran en la tabla 2. Debido a la baja polaridad de los complejos metálicos, estos tuvieron que ser disueltos en Dimetilsulfóxido (DMSO). Además, el set de complejos polioles tuvo que ser expuestos a baño de ultrasonidos durante 2 a 3 horas para lograr la disolución completa. La colistina (Sigma L: 49H0635, 100mg Potencia: 19740 UI/mg) fue disuelta en agua desionizada estéril.

**Tabla 2.** Características de los compuestos que se evaluaron en su capacidad antibiofilm

| Tipo de compuesto | Compuesto                            | Masa molecular (g/mol) | Solvente | Solución stock (µg/mL) |
|-------------------|--------------------------------------|------------------------|----------|------------------------|
| Polipéptido       | Colistina                            | 1155.45                | Agua     | 5120                   |
| Cu-sulfonamidas   | Cu-sulfametoxazol (1) marrón verdoso | 586.12                 | DMSO     | 5120                   |
|                   | Cu-sulfametoxazol (2) marrón         | 586.12                 | DMSO     | 5120                   |
|                   | Cu-sulfadiazina                      | 580.06                 | DMSO     | 2560                   |
|                   | Cu-sulfacloropiridazina              | 648.98                 | DMSO     | 5120                   |
|                   | Cu-sulfametazina                     | 636.14                 | DMSO     | 5120                   |
|                   | Cu-sulfametizol                      | 620.16                 | DMSO     | 1280                   |
|                   | Ag-SCP                               | ---                    | DMSO     | 200                    |
|                   | Ag-SMX                               | ---                    | DMSO     | 200                    |
|                   | Ag-SCN-SCP                           | ---                    | DMSO     | 200                    |
| M-Polioles        | Cu-manitol                           | 821.00                 | DMSO     | 200                    |
|                   | Cu-sorbitol                          | 857.00                 | DMSO     | 200                    |
|                   | Co-sorbitol                          | 858.70                 | DMSO     | 200                    |
|                   | Zn-xylitol                           | ---                    | DMSO     | 200                    |
|                   | Cu eritritol                         | ---                    | DMSO     | 200                    |
|                   | Cu-xylitol                           | ---                    | DMSO     | 200                    |
|                   | Ni-sorbitol                          | ---                    | DMSO     | 200                    |

Aclaraciones: M: metal, SCP: sulfacloropiridazina; SMX: sulfamoxol; SCN: tiocianato; DMSO: Dimetilsulfoxido.

### 5.1 Concentración inhibitoria mínima

Para determinar la CIM a colistina en los aislamientos en estudio se realizó el ensayo de microdilución en caldo (ensayo de referencia) siguiendo las recomendaciones de las guías internacionales EUCAST y CLSI (EUCAST & CLSI, 2016).. La droga utilizada fue Colistin sulfato Sigma L: 49H0635, 100mg Potencia: 19740UI/mg = 655,368 µg/mg. Se utilizó la cepa *E.coli* ATCC 25922 como control de sensibilidad y una cepa *E.coli* con el gen plasmídico *mcr-1* como control de resistencia. El rango de concentraciones ensayado fue 0,25 a 512 µg/mL. Para la interpretación de los resultados se utilizaron los puntos de corte que establece el documento guía EUCAST 2022 (EUCAST, 2022).

Para el resto de los compuestos la CIM se determinó por método de microdilución en caldo, de modo similar al ensayo con colistina. A partir de un inóculo fresco en fase exponencial de crecimiento se prepara una suspensión equivalente al 0.5 MacFarland de cada aislamiento a ensayar. Se hace una dilución 1/100 del inóculo y se dispensan 100 µl del inóculo en cada pocillo (concentración de inóculo  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL). Se llenan tantos pocillos como cantidad de disoluciones de compuesto a ensayar, más uno que sirve como control de crecimiento. Se prepararon las diluciones seriadas de los compuestos y se dispensó 100 µl en cada pocillo (concentración final de inóculo  $2-8 \times 10^5$  UFC/mL). Se incubó la placa con tapa estéril por 16-20 horas a 37°C en atmósfera aerobia. La CIM se determinó como la concentración más baja de antibiótico que inhibe completamente el crecimiento del organismo en los pocillos de microdilución detectados visualmente.

### 6. Producción de biofilm

Para analizar la capacidad de producción de biofilm de los aislamientos se utilizó un método basado en la capacidad bacteriana de adherirse a las paredes de una policubeta de poliestireno y luego mediante tinción con cristal violeta medir de manera indirecta el biofilm formado. El ensayo se realizó siguiendo los pasos de los protocolos descritos por O'Toole y Naves con modificaciones (O'Toole, 2011) (Naves et al., 2008). Con el fin de evaluar las mejores condiciones para la producción de biofilm, se realizó el ensayo usando diferentes medios de cultivos y distinto tiempos de incubación. Los medios de cultivo probados fueron TSB (glucosa 2,5g/L, NaCl 5g/L,  $K_2HPO_4$  2,5g/L, digerido pancreática de caseína 17g/L, digerido papaico de soja 3g/L), LBB (NaCl 10g/L,

extracto de levadura 5g/L, peptona 10g/L, pH 7.5) y M9 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6,7g/L, NaCl 0,5g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1g/L,  $\text{MgSO}_4$  2mM,  $\text{CaCl}_2$  0.1mM) con y sin glucosa al 20%. Los tiempos de incubación fueron 24 y 48hs.

A partir de un cultivo puro y fresco, se inoculó cada cepa a ensayar en 3 mL de medio de cultivo líquido y se incubó durante 24 horas a 35 °C. Los cultivos obtenidos se ajustaron a la misma densidad óptica ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$  equivalente a 0,5 McFarland) y se diluyeron 1/1000 en medio de cultivo. Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cada inóculo diluido a los pocillos de la placa (Placa Aglutinación 96 pocillos, fondo plano, Deltalab), por quintuplicado.

Luego de incubar durante 24 o 48 horas, se descartó el contenido de la placa utilizando pipeta automática, cuidando de no tocar el biofilm con la punta de la pipeta. Cada pocillo fue lavado tres veces con 200  $\mu\text{L}$  de suero fisiológico, también con pipeta automática.

Finalizados los lavados, la placa se dejó secar colocándola boca abajo sobre una superficie cubierta con papel absorbente y golpeando suavemente para retirar la mayor cantidad posible del líquido residual. Posteriormente, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta al 0,1% y se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

El exceso de colorante se retiró con pipeta automática, evitando salpicaduras, y se realizaron tres lavados con suero fisiológico. La placa se dejó secar nuevamente de la forma descrita anteriormente. El cristal violeta retenido en las paredes de los pocillos se disolvió añadiendo etanol al 95% durante 10 minutos. Finalmente, se midió la  $\text{DO}_{590\text{nm}}$  en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Scientific). El ensayo se realizó dos veces. Se utilizó como control negativo 6 pocillos que recibieron el mismo tratamiento que el resto, pero con el agregado de medio de cultivo en lugar de inóculo. Para el análisis de los resultados fueron considerados los conjuntos de datos para cada experimento cuando el coeficiente de variación (CV) fue menor al 30%.

Se evaluó la formación de biofilm de los aislamientos usando el medio de cultivo y el tiempo de incubación que mostro mayor biomasa en la formación de biofilm.

Los aislamientos se clasificaron teniendo en cuenta su capacidad de producción de biofilm en categorías según el valor de  $\text{DO}_{590\text{nm}}$  obtenido. Se consideran como no productores cuando la  $\text{DO}$  es  $\leq \text{DOc}$  (siendo  $\text{DOc} = \text{DO}_{\text{control negativo}} + 3$  desviaciones estándar), débil productor de biofilm cuando  $\text{DOc} < \text{DO} \leq 2 \times \text{DOc}$ , moderado productor de biofilm cuando  $2 \times \text{DOc} < \text{DO} \leq 4 \times \text{DOc}$  y fuerte productor de biofilm cuando  $\text{DO} > 4 \times \text{DOc}$  (Stepanović et al., 2000).

## 7. Evaluación de compuestos en su capacidad antibiofilm

Para la evaluación de la actividad antibiofilm, se efectuaron ensayos de inhibición y erradicación de biofilm empleando la cepa 54-1. Los compuestos evaluados fueron los que se detallan en la Tabla 2. En los ensayos de inhibición de biofilm por acción de la colistina se utilizó además la cepa 54-2 y 5 cepas de *Kp* resistente a colistina, previamente caracterizados por el grupo de trabajo (ver tabla 3).

**Tabla 3.** Características clínicas y fenotípicas de los aislamientos de *Kp* resistentes a colistina

| Aislamiento | Año  | Sitio           | CIM (mg/L) por Vitek |         |         |        |         |        |           |           | CIM (mg/L) por MDC |
|-------------|------|-----------------|----------------------|---------|---------|--------|---------|--------|-----------|-----------|--------------------|
|             |      |                 | TZP                  | CTX     | CAZ     | GM     | AMK     | CIP    | IMP       | MEM       | COL                |
| M1366       | 2016 | Orina           | ≥128 (R)             | ≥64 (R) | ≥64 (R) | 4 (R)  | ≥64 (R) | ≥4 (R) | 2 (I)     | 4 (R)     | 32 (R)             |
| FQ1180366   | 2017 | Orina           | ≥128 (R)             | ≥64 (R) | ≥64 (R) | 16 (R) | ≥64 (R) | ≥4 (R) | ≥16 (R)   | 8 (R)     | ≥128 (R)           |
| FQ38879     | 2017 | SD              | ≥128 (R)             | 8 (R)   | 16 (R)  | 2 (I)  | 16 (R)  | ≥4 (R) | ≥16 (R)   | ≥16 (R)   | 64 (R)             |
| M1604       | 2017 | Hisopado rectal | ≥128 (R)             | ≥64 (R) | ≥64 (R) | ≤1 (S) | 16 (R)  | ≥4 (R) | 4 (R)     | 4 (R)     | 16 (R)             |
| 24Kp09      | 2018 | Hisopado rectal | ≥128 (R)             | ≥64 (R) | ≥64 (R) | ≤1 (S) | 8 (S)   | ≥4 (R) | ≤0.25 (S) | ≤0.25 (S) | 16 (R)             |

Aclaraciones: CIM: concentración inhibitoria mínima, TZP: Piperacilina/tazobactam, CTX: Cefotaxime, CAZ: Ceftazidime, GM: Gentamicina, AMK: Amicacina, CIP: Ciprofloxacina, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, COL: colistina, MDC: Microdilución en Caldo, S: susceptible, R: resistente, I: intermedio, SD: sin datos.

### 7.1 Inhibición de Biofilm

El ensayo se realizó siguiendo el método estático con técnica de cristal violeta. A partir de un cultivo puro y fresco, se inoculó cada cepa a ensayar en 3 mL de medio de cultivo líquido y se incubó durante 24 horas a 35 °C. Los cultivos obtenidos se ajustaron a la misma densidad óptica ( $DO_{600nm}$  equivalente a 0,5 McFarland) y se diluyeron 1/1000 en medio de cultivo. Por otro lado, se prepararon diluciones seriadas de los compuestos a evaluar en medio de cultivo. A cada pocillo se añadieron 100  $\mu$ L del inóculo diluido y 100  $\mu$ L de la dilución correspondiente del compuesto. Cada concentración fue evaluada por triplicado. La placa se cubrió con su tapa estéril y se incubó por 24 horas a 37°C. Luego de la incubación, la placa se manipuló siguiendo los mismos pasos de lavado, tinción y lectura descritos en el procedimiento de formación de biofilm. Los ensayos

se realizaron por duplicado. En cada experimento se incluyeron pocillos con medio de cultivo sin inóculo, como control negativo (blanco), y pocillos con inóculo sin agregado de compuesto, como control de biofilm. También se ensayó un control con DMSO a la misma concentración presente en cada una de las condiciones evaluadas para determinar su comportamiento frente al biofilm.

Las concentraciones ensayadas fueron para inhibición por colistina, en aislamientos sensibles 0.5 a 0.0625 µg/mL y para los aislamientos resistentes 0.125 a 16 µg/mL, excepto en los aislamientos 24Kp09 y M1604, donde el rango fue 0.125 a 8 µg/mL. Para los polioles, se evaluó un rango de 1 a 16 µg/mL; para los complejos de Cu-sulfonamidas, el rango fue de 40 a 320 µg/mL; y para los complejos de Ag-sulfonamidas, de 1 a 8 µg/mL.

Para representar los resultados, se graficó el porcentaje de inhibición de biofilm en función de la concentración de compuesto evaluada. El cálculo se realizó mediante la fórmula: porcentaje de inhibición =  $100 - ((\text{DO biofilm formado en presencia de compuesto} \times 100) / \text{DO biofilm formado en ausencia de compuesto})$ .

Para el análisis estadístico se utilizó el software Graphpad Prism v6.0c (GraphPad Software Inc., USA) (<https://www.graphpad.com/>). Para la comparación de las concentraciones de los compuestos se usó el test múltiple de t de student y el método Holm-Sidak, con  $\alpha < 0.05$ .

## 7.2 Erradicación de Biofilm

Para los ensayos de erradicación de biofilm, se seleccionaron los compuestos que mostraron mejores resultados en los ensayos de inhibición de biofilm, los cuales se enfrentaron al biofilm de la cepa 54-1. El biofilm se formó previamente en placas de 96 pocillos, en condiciones estáticas, según el procedimiento de formación de biofilm. Una vez establecido el biofilm, los pocillos fueron lavados y secados como se detalló en el procedimiento de formación de biofilm, y se añadieron 200 µL de cada concentración de los compuestos a ensayar, por triplicado. La placa se incubó durante 24 horas a 37 °C. Posteriormente, el contenido de los pocillos fue retirado con pipeta automática y la placa fue lavada y secada como se describe en el procedimiento de formación de biofilm. Finalmente, el biofilm se tiñó 200 µL con cristal violeta y se continuó con el mismo procesamiento ya descrito en el procedimiento de formación de biofilm.

En cada experimento se incluyeron pocillos con medio de cultivo sin inóculo, como control negativo (blanco), y pocillos con inóculo sin agregado de compuesto, como control de biofilm.

Los polioles metálicos y las sulfonamidas de Ag, se evaluaron en concentraciones de 0.25 a 2 µg/mL. En el caso de las sulfonamidas de Cu, se probaron concentraciones en el rango de 2 a 16 µg/mL. Para cada ensayo se incluyó un control con DMSO a la misma concentración presente en cada una de las condiciones evaluadas.

Para representar los resultados, se graficó el porcentaje de erradicación de biofilm en función de la concentración de compuesto evaluada. El cálculo se realizó mediante la fórmula: porcentaje de erradicación =  $100 - ((\text{DO biofilm en presencia de compuesto} \times 100) / \text{DO biofilm en ausencia de compuesto})$ . Los datos se analizaron estadísticamente de igual forma que en el ensayo de inhibición de biofilm.

## Resultados y discusión

### Estudio de los antibiótipos

Todos los aislamientos en estudio presentaron resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y al trimetoprim/sulfametoxazol, con valores de CIM elevados. En cuanto al resto de los antibióticos, los aislamientos presentaron diferentes grados de sensibilidad. En base a los perfiles de resistencia, se identificaron cinco antibiótipos, de los cuales seis fueron clasificados como XDR, y uno como PDR (Tabla 4). Los aislamientos 54-1 y 54-2 difirieron en la CIM de las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Se observó que el aislamiento Kp21 presentó una CIM más baja en la cefalosporina de cuarta generación, en imipenem y meropenem. Además, el aislamiento Kp23 mostró resistencia a todos los antibióticos ensayados, incluyendo aztreonam, siendo el único clasificado como PDR (Tabla 4).

**Tabla 4.** Clasificación de los aislamientos en distintos antibiótipos según su CIM a  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y gliciliciclina

| Aislamiento          | Antibiótipo | C3G |     | C4G       | Carbapenems |           | Aminoglucósidos |           | Quinolona | Monobactam | CLF |
|----------------------|-------------|-----|-----|-----------|-------------|-----------|-----------------|-----------|-----------|------------|-----|
|                      |             | CRO | CAZ | FEP       | IMP         | MEM       | AK              | GE        | CIP       | ATM        |     |
| 54-1                 | 1           | 4   | 8   | 2         | 4           | 1         | 4               | $\geq 16$ | >4        | S/D        | XDR |
| 54-2                 | 2           | >64 | >64 | >64       | 4           | 1         | $\leq 2$        | $\geq 16$ | >4        | S/D        | XDR |
| Kp21                 | 3           | >64 | >64 | 4         | 8           | 8         | $\geq 32$       | $\geq 16$ | >4        | S*         | XDR |
| Kp16<br>Kp20<br>Kp22 | 4           | >64 | >64 | $\geq 32$ | $\geq 16$   | $\geq 16$ | $\geq 32$       | $\geq 16$ | >4        | S*         | XDR |
| Kp23                 | 5           | >64 | >64 | $\geq 32$ | $\geq 16$   | $\geq 16$ | $\geq 32$       | $\geq 16$ | >4        | 4          | PDR |

Aclaraciones: Los valores de CIM son los obtenidos con el equipo automatizado Vitek. Se marca en rojo cuando el valor de CIM se interpreta como resistente, en azul cuando se interpreta como intermedio y en verde cuando se interpreta como sensible, C3G: cefalosporina de 3era generación, C4G: cefalosporina de 4<sup>ta</sup> generación, CLF: clasificación, CRO: ceftriaxona, CAZ: ceftazidime, FEP: cefepime, IMP: imipenem, MEM: meropenem, AK: amicacina, GE: gentamicina, CIP: ciprofloxacina, ATM: aztreonam, COL: colistina, S/D: sin dato; S: sensible, \*: realizado por método de disco difusión.

Todos los aislamientos fueron productores de carbapenemasa, dos de ellos (54-1 y 54-2) expresan la serin carbapenemasa KPC y los otros cinco la metalo carbapenemasa NDM. Además, dos de ellos (54-2 y Kp23), resultaron ser también productores de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido.

Considerando los diferentes antibiótipos se seleccionaron 5 aislamientos para la secuenciación del genoma completo. Se eligieron los aislamientos 54-1 y 54-2 (antibiótipo 1 y 2) que tienen distinto

perfil de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, son parte del mismo brote y tienen diferente morfotipo de colonia, para su comparación genómica. Por otro lado, dentro del grupo de los aislamientos productores de metalcarbapenemasa, se secuenciaron los genomas de los aislamientos Kp21 (antibiotipo 3) que presenta un perfil diferente de resistencia a carbapenémicos y al cefepime, el aislamiento Kp20 como representante del antibiotipo 4 y el aislamiento Kp23 (antibiotipo 5) que es el único clasificado como PDR.

### Determinación de la CIM al colistin

Los ensayos de microdilución en caldo para la colistina mostraron que los aislamientos 54-1 y 54-2 eran sensibles, con una MIC = 1 $\mu$ g/mL, mientras que los aislamientos Kp16, Kp20, Kp21, Kp22 y Kp23 fueron resistentes con valores de MIC entre 16 $\mu$ g/mL y 128 $\mu$ g/mL (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados del ensayo de microdilución en caldo para colistina.

| Aislamiento             | Concentración de antibiótico ( $\mu$ g/mL) |      |     |   |   |   |   |    |    |    |     | CP | CIM ( $\mu$ g/ml) |
|-------------------------|--------------------------------------------|------|-----|---|---|---|---|----|----|----|-----|----|-------------------|
|                         | 0,125                                      | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 |    |                   |
| E.coli ATCC 25922       | X                                          | X    | X   | - | - | - | - | -  | -  | -  | -   | X  | 1                 |
| 24Ec05 ( <i>mcr 1</i> ) | X                                          | X    | X   | X | X | X | - | -  | -  | -  | -   | X  | 8                 |
| 54-1                    | X                                          | X    | X   | - | - | - | - | -  | -  | -  | -   | X  | 1                 |
| 54-2                    | X                                          | X    | X   | - | - | - | - | -  | -  | -  | -   | X  | 1                 |
| Kp16                    | X                                          | X    | X   | X | X | X | X | X  | -  | -  | -   | X  | 32                |
| Kp20                    | X                                          | X    | X   | X | X | X | X | X  | X  | X  | -   | X  | 128               |
| Kp21                    | X                                          | X    | X   | X | X | X | X | X  | -  | -  | -   | X  | 32                |
| Kp22                    | X                                          | X    | X   | X | X | X | X | X  | -  | -  | -   | X  | 32                |
| Kp23                    | X                                          | X    | X   | X | X | X | X | -  | -  | -  | -   | X  | 16                |
| CN                      | -                                          | -    | -   | - | - | - | - | -  | -  | -  | -   |    |                   |

Aclaraciones: Control sensible: E. coli ATCC 25922, control resistente: 24Ec05 (*mcr-1*), CN: control negativo (medio de cultivo sin inóculo bacteriano), CP: control de crecimiento (inóculo bacteriano sin agregado de colistina). Se muestra con un X los pocillos donde hubo crecimiento bacteriano y con – los pocillos donde no se observa crecimiento. La MIC se determinó como el primer pocillo donde no se observa crecimiento bacteriano

## 1. Caracterización genómica de los aislamientos

### 1.1 Secuenciación de genomas completos

En este proyecto de tesis se secuenciaron 5 genomas completos de *Kp* mediante metodología de Illumina y Nanopore. Los datos obtenidos a partir de la secuenciación fueron procesados y ensamblados utilizando herramientas bioinformáticas avanzadas, logrando ensamblajes pulidos de alta calidad. Los parámetros de calidad de los genomas secuenciados y ensamblados se encuentran en las tablas 6 y 7. Como se puede observar en la tabla 7, los aislamientos 54-1 y 54-2 presentan un número bajo de contigs (6), lo que indica ensamblajes de alta calidad. En contraste, los aislamientos Kp20, Kp21 y Kp23 tienen entre 11 y 17 contigs, reflejando un ensamblaje más fragmentado, que podría estar relacionado con factores técnicos, como menor cobertura de secuenciación, o con características genómicas específicas de los aislamientos, como la presencia de elementos repetitivos, elementos transponibles, secuencias de inserción, entre otras (Peona et al., 2021).

Las longitudes totales de los ensamblajes oscilan entre 5.5 y 6.1 Mbp. Estudios previos indican que el tamaño promedio del genoma de *Kp* varía entre 5.0 y 6.5 Mbp, dependiendo de la cepa y de los elementos genéticos móviles presentes (Pei et al., 2022). Por tanto, las longitudes observadas están dentro del rango esperado, aunque el tamaño mayor de Kp23 podría indicar la presencia de plásmidos grandes, islas genómicas o regiones con ADN repetitivo. El contenido GC en los ensamblajes varía ligeramente entre 56.5% y 57.3%. Esto concuerda con el rango reportado para *Kp*, cuyo contenido GC típico es de aproximadamente 57% (Rafiq et al., 2016).

Los valores N50 y L50 son consistentes con ensamblajes de alta calidad, especialmente en 54-1 y 54-2, con N50 superiores a 5.2 Mbp y L50 de 1. Estos resultados indican que casi todo el genoma está contenido en contigs largos y bien ensamblados. Por otro lado, Kp23 tiene un N50 más bajo (4.0 Mbp), lo que refleja una mayor fragmentación del ensamblaje.

Un aspecto para destacar de este estudio es el logro de obtener genomas completamente cerrados para los aislamientos 54-1 y 54-2, tanto de la secuencia cromosómica como de los plásmidos. Estos ensamblajes proporcionan una representación completa y continua de los genomas, eliminando las incertidumbres asociadas a brechas o fragmentos sin resolver. Por otro lado,

aunque los genomas de los aislamientos Kp20, Kp21 y Kp23 no están completamente cerrados, sus ensamblajes son igualmente de alta calidad, como lo demuestra su bajo número de contigs (entre 11 y 17) y valores de N50 cercanos al tamaño del genoma completo de *Kp*. Si bien las secuencias cromosómicas no están cerradas, sí se logró obtener plásmidos circulares cerrados, por lo tanto, estos ensamblajes son adecuados para los estudios comparativos y de diversidad genética.

**Tabla 6.** Parámetros de calidad de los genomas secuenciados

| Aislamiento              | 54-1     |      | 54-2     |      | Kp20     |      | Kp21     |      | Kp23     |      |
|--------------------------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
|                          | N° genes | %    | N° genes | %    | N° genes | %    | N° genes | %    | N° genes | %    |
| Completos                | 434      | 98.7 | 434      | 98.7 | 434      | 98.7 | 434      | 98.7 | 435      | 98,9 |
| Completos en copia única | 432      | 98.2 | 432      | 98.2 | 432      | 98.2 | 432      | 98.2 | 433      | 98,4 |
| Completos duplicados     | 2        | 0.5  | 2        | 0.5  | 2        | 0.5  | 2        | 0.5  | 2        | 0.5  |
| Fragmentados             | 1        | 0.2  | 1        | 0.2  | 1        | 0.2  | 1        | 0.2  | 1        | 0.2  |
| No encontrados           | 5        | 1.1  | 5        | 1.1  | 5        | 1.1  | 5        | 1.1  | 4        | 0,9  |

Aclaraciones: Parámetros obtenidos con BUSCO v5.3.0. %: porcentaje de genes encontrados respecto a un genoma de referencia de *Kp*.

**Tabla 7.** Parámetros de calidad de los genomas ensamblados

| Aislamiento | Numero de contigs | Largo de secuencia (pb) | Contenido GC (%) | N50       | L50 | Genoma cerrado | % de integridad | Contaminación | % de calidad |
|-------------|-------------------|-------------------------|------------------|-----------|-----|----------------|-----------------|---------------|--------------|
| 54-1        | 6                 | 5.573.355               | 57,3             | 5.241.028 | 1   | Si             | 97,2            | 0,9           | 92,7         |
| 54-2        | 6                 | 5.580.277               | 57,3             | 5.240.925 | 1   | Si             | 97,2            | 0,9           | 92,7         |
| Kp20        | 12                | 5.773.184               | 57,0             | 5.036.565 | 1   | No             | 97,2            | 0,9           | 92,7         |
| Kp21        | 11                | 5.744.288               | 57,1             | 5.031.436 | 1   | No             | 97,2            | 0,9           | 92,7         |
| Kp23        | 17                | 6.118.531               | 56,5             | 4.005.091 | 1   | No             | 97,2            | 0,9           | 92,7         |

Aclaraciones: Parámetros obtenidos con la herramienta web Microbial Genome Atlas (MiGA)

## 1.2 Anotación de los genomas

La anotación de los genomas permitió conocer el número de secuencias codificantes (SCD), genes de ARN de transferencia y genes de ARN ribosomal (Tabla 8). Los valores de SCD obtenidos varían entre 5482 y 6118. Los genomas cerrados (54-1 y 54-2) presentan un número ligeramente menor de CDS en comparación con los ensamblajes no cerrados. Esto puede atribuirse a que los genomas no cerrados incluyen regiones adicionales que podrían contener genes funcionales o pseudogenes, derivados de elementos genéticos móviles o regiones repetitivas. Así como también

contener mayor número de genes accesorios como ser genes de resistencia, genes de virulencia, plásmidos y otros elementos relacionados con la transferencia horizontal de genes (Rocha et al., 2022). El mayor número de CDS en Kp23 (6118) es consistente con su mayor longitud genómica (6.1 Mpb). Sin embargo, los valores generales de CDS en todos los aislamientos están en línea con los reportados para *Kp*, cuyo número promedio de CDS típicamente varía entre 5000 y 6000 (Martin & Bachman, 2018). En todos los aislamientos se identificaron 25 genes de ARNr, lo cual es característico de *Kp*. El número de genes de ARNt también es consistente entre los aislamientos (ATCC 15380, 2023)(ATCC 700721, 2022).

**Tabla 8.** Características de los genomas anotados

| Aislamiento | Numero de contigs | Largo de la secuencia (pb) | CDS  | ARNr | ARNt |
|-------------|-------------------|----------------------------|------|------|------|
| 54-1        | 6                 | 5.573.355                  | 5482 | 25   | 89   |
| 54-2        | 6                 | 5.580.277                  | 5506 | 25   | 89   |
| Kp20        | 12                | 5.773.184                  | 5688 | 25   | 90   |
| Kp21        | 11                | 5.744.288                  | 5628 | 25   | 90   |
| Kp23        | 17                | 6.118.531                  | 6118 | 25   | 90   |

Aclaraciones: CDS: secuencias codificantes, ARNr: ARN ribosomal. ARNt: ARN de transferencia.

### 1.3 Análisis genómico

Los aislamientos fueron caracterizados basado en la portación de genes de resistencia, de genes de virulencia, contenido de plásmidos, *Multilocus Sequence Typing* (MLST) y el tipo capsular.

#### 1.3.1 Determinantes de resistencia

Los resultados de los genes de resistencia y mutaciones puntuales se presentan en las tablas 9 y 10. Como se puede observar en todos los aislamientos se identificó una amplia variedad de genes de resistencia a aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas, sulfonamidas y trimetoprima. Los aislamientos productores de KPC-2 (54-1 y 54-2) presentaron los mismos genes de resistencia, con la excepción del gen de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, que se detectó únicamente en el aislamiento 54-2. Además, ambos aislamientos comparten las mismas mutaciones puntuales en los genes *acrR* y las porinas *ompK36* y *ompK37*, los cuales está asociado con resistencia a fluoroquinolonas y  $\beta$ -lactámicos respectivamente (Schneiders et al., 2003) (Doménech-Sánchez et al., 1999).

En los tres aislamientos productores de NDM se detectó la presencia del gen *bla*<sub>NDM-5</sub>. Los aislamientos Kp20 y Kp21 exhiben un perfil idéntico de genes de resistencia. Sin embargo, el aislamiento Kp23 presenta de forma adicional los genes de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>CTX-M-172</sub>, junto con los genes *qnrB* y *aac(6')-Ib-cr*, los cuales confieren resistencia quinolonas y aminoglucósidos. Además, en los 3 aislamientos se identificaron las mismas mutaciones puntuales en los genes *gyrA*, *parC*, *accR*, *ompK36* y *ompK37*.

**Tabla 9.** Genes de resistencia a antibióticos en los genomas secuenciados

| Aislamiento                 | 54-1                                                                                                                           | 54-2                                                                                                                                                             | Kp20                                                                                            | Kp21                                                                                            | Kp23                                                                                                                                                                                            |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\beta$ -lactámicos         | <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub><br><i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub><br><i>bla</i> <sub>OXA-1</sub><br><br><i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> | <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub><br><i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub><br><i>bla</i> <sub>OXA-1</sub><br><i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub><br><br><i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> | <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub><br><i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub><br><br><i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> | <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub><br><i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub><br><br><i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> | <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub><br><i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub><br><i>bla</i> <sub>OXA-1</sub><br><i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub><br><i>bla</i> <sub>CTX-M-172</sub><br><i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> |
| Aminoglucósidos             | <i>aac(3)-IId</i><br><br><i>aac(6')-Ib-cr</i><br><i>aph(3')-Ia</i>                                                             | <i>aac(3)-IId</i><br><br><i>aac(6')-Ib-cr</i><br><i>aph(3')-Ia</i>                                                                                               | <i>aadA2</i><br><br><i>aph(3')-ib</i><br><i>aph(6')-Id</i><br><i>rmtB</i>                       | <i>aadA2</i><br><br><i>aph(3')-ib</i><br><i>aph(6')-Id</i><br><i>rmtB</i>                       | <i>aadA2/A1</i><br><i>aac(6')-Ib-cr</i><br><br><i>aph(3')-ib</i><br><i>aph(6')-Id</i><br><i>rmtB</i>                                                                                            |
| Sulfonamidas y Trimetoprima | <i>sul1</i><br><br><i>dfrA30</i>                                                                                               | <i>sul1</i><br><br><i>dfrA30</i>                                                                                                                                 | <i>sul1</i><br><i>sul2</i><br><i>dfrA12</i><br><i>dfrA14</i>                                    | <i>sul1</i><br><i>sul2</i><br><i>dfrA12</i><br><i>dfrA14</i>                                    | <i>sul1</i><br><i>sul2</i><br><i>dfrA12</i><br><i>dfrA14</i>                                                                                                                                    |
| Quinolonas                  | <i>gyrA-83I</i><br><br><i>parC-80I</i><br><i>qnrB1</i><br><i>OqxA</i><br><i>OqxB</i>                                           | <i>gyrA-83I</i><br><br><i>parC-80I</i><br><i>qnrB1</i><br><i>OqxA</i><br><i>OqxB</i>                                                                             | <i>gyrA-83I</i><br><i>gyrA-87N</i><br><i>parC-80I</i><br><br><i>OqxA</i><br><i>OqxB</i>         | <i>gyrA-83I</i><br><i>gyrA-87N</i><br><i>parC-80I</i><br><br><i>OqxA</i><br><i>OqxB</i>         | <i>gyrA-83I</i><br><i>gyrA-87N</i><br><i>parC-80I</i><br><i>qnrB1</i><br><i>OqxA</i><br><i>OqxB</i>                                                                                             |
| Macrólidos                  | <i>mph(A)</i>                                                                                                                  | <i>mph(A)</i>                                                                                                                                                    | <i>mph(A)</i><br><i>ermB</i>                                                                    | <i>mph(A)</i><br><i>ermB</i>                                                                    | <i>mph(A)</i><br><i>ermB</i>                                                                                                                                                                    |
| Tetraciclinas               | <i>tetA/D</i>                                                                                                                  | <i>tetA/D</i>                                                                                                                                                    |                                                                                                 |                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                 |
| Fosfomicina                 | <i>fosA6</i>                                                                                                                   | <i>fosA6</i>                                                                                                                                                     | <i>fosA6</i>                                                                                    | <i>fosA6</i>                                                                                    | <i>fosA6</i>                                                                                                                                                                                    |

**Tabla 10.** Mutaciones puntuales asociadas a resistencia antimicrobiana

| Aislamiento   | 54-1  | 54-2  | Kp20  | Kp21  | Kp23  |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>acrR</i>   | P161R | P161R | P161R | P161R | P161R |
|               | G164A | G164A | G164A | G164A | G164A |
|               | F172S | F172S | F172S | F172S | F172S |
|               | R173G | R173G | R173G | R173G | R173G |
|               | L195V | L195V | L195V | L195V | L195V |
|               | F197I | F197I | F197I | F197I | F197I |
|               | K201M | K201M | K201M | K201M | K201M |
| <i>ompK36</i> | N49S  | N49S  | N49S  | N49S  | N49S  |
|               | L59V  | L59V  | L59V  | L59V  | L59V  |
|               | G189T | G189T | T184P | T184P | T184P |
|               | F198Y | F198Y |       |       |       |
|               | F207Y | F207Y |       |       |       |
|               | A217S | A217S |       |       |       |
|               | T222L | T222L |       |       |       |
|               | D223G | D223G |       |       |       |
|               | E232R | E232R |       |       |       |
|               | N304E | N304E |       |       |       |
| <i>ompK37</i> | I70M  | I70M  | I70M  | I70M  | I70M  |
|               | I128M | I128M | I128M | I128M | I128M |
|               | N230G | N230G | N230G | N230G | N230G |

Aclaraciones: datos obtenidos de la base de datos del *Center for genomic epidemiology*.

La presencia de *Kp* productora de NDM en nuestro país ha aumentado de forma considerable en los últimos años, siendo la variante NDM-1 la única reportada hasta el momento.

NDM-5 se distingue de otras variantes por las mutaciones puntuales en las posiciones 88 (Val→Leu) y 154 (Met→Leu) de la proteína. Esta variante fue identificada por primera vez en Reino Unido de un aislamiento multirresistente de *Escherichia coli* de un paciente que había estado internado en la India (Hornsey et al., 2011). Desde entonces, se ha diseminado en todo el mundo en distintos hospederos, siendo más prevalente en *E. coli* y con frecuencia se encuentra en plásmidos de tipo IncX3 (Wu et al., 2019) (Hu et al., 2022). En *Kp*, NDM-5 ha sido reportada en varias regiones del mundo como causante de brotes intrahospitalarios, asociado a clones epidémicos de alto riesgo, como los asociados al CC258 y el ST307 (Zhu et al., 2024) (Álvarez et al., 2024). Por otro lado, se ha observado que *Kp* portadora de *bla*<sub>NDM-5</sub> muestra niveles más altos de resistencia a los antibióticos en comparación con aquella que portan *bla*<sub>NDM-1</sub> (Hornsey et al., 2011). En Argentina, la detección de *Kp* productora de NDM-5 fue recientemente reportada en un plásmido de tipo IncFII (Alvarez et al., 2024), similar a lo que se describe en este trabajo. En nuestro país la aparición de NDM-5 en *Kp* fue reportada por primera vez por Papa-Ezdra y sus

colaboradores y por nuestro grupo de trabajo con los aislamientos de esta tesis (Papa-Ezdra et al., 2024) (Magallanes et al., 2025).

### 1.3.2 Detección de plásmidos

La secuenciación de los aislamientos reveló la presencia de varios plásmidos pertenecientes a diferentes grupos de incompatibilidad, cuyas características se presentan en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Características de las secuencias plasmídicas

| Aislamiento | cantidad de secuencias plasmídicas | Grupo de incompatibilidad | Contenido GC (%) | Largo (pb) | Secuencia circular (Cerrado) |
|-------------|------------------------------------|---------------------------|------------------|------------|------------------------------|
| 54-1        | 5                                  | IncFIB(K)/IncFII(K)       | 52,8             | 199.521    | Si                           |
|             |                                    | IncFIB(pQil)              | 54,2             | 69.570     | Si                           |
|             |                                    | IncN                      | 52,9             | 55.144     | Si                           |
|             |                                    | N/D                       | 52,0             | 8.816      | Si                           |
|             |                                    | N/D                       | 43,1             | 7.111      | Si                           |
| 54-2        | 5                                  | IncFIB(K)/IncFII(K)       | 52,8             | 200.720    | Si                           |
|             |                                    | IncFIB(pQil)              | 52,4             | 75.085     | Si                           |
|             |                                    | IncN                      | 53,1             | 53.942     | Si                           |
|             |                                    | N/D                       | 51,3             | 4.407      | Si                           |
|             |                                    | N/D                       | --               | 3.556      | Si                           |
| Kp20        | 5                                  | IncR / IncN               | 54.1             | 48.005     | Si                           |
|             |                                    | IncFIB(K)/IncFII          | 52.7             | 237.738    | Si                           |
|             |                                    | N/D                       | 41.5             | 16.643     | Si                           |
|             |                                    | N/D                       | 44.4             | 15.926     | Si                           |
|             |                                    | N/D                       | 52.1             | 8.402      | No                           |
| Kp21        | 5                                  | IncR / IncN               | 54.1             | 47.977     | Si                           |
|             |                                    | IncFIB(K)/IncFII          | 52.7             | 237.717    | Si                           |
|             |                                    | N/D                       | 41.3             | 16.659     | Si                           |
|             |                                    | N/D                       | --               | 3.459      | No                           |
|             |                                    | N/D                       | --               | 787        | No                           |
| Kp23        | 6                                  | IncR / IncN               | 54.1             | 47.980     | Si                           |
|             |                                    | IncFIB(K)/IncFII          | 52.2             | 228.063    | No                           |
|             |                                    | IncHI2/ IncHI2A/RepA      | 46.5             | 195.016    | No                           |
|             |                                    | N/D                       | 47.0             | 122.692    | No                           |
|             |                                    | N/D                       | 44.4             | 11.940     | Si                           |
|             |                                    | N/D                       | 41.5             | 8.323      | Si                           |

Aclaraciones: N/D: no detectado.

Los aislamientos 54-1 y 54-2 contienen cinco secuencias plasmídicas, de las cuales solo tres están asociadas a uno o más grupos de incompatibilidad. En ambos aislamientos, se obtuvieron las cinco secuencias plasmídicas cerradas. Como se muestra en la Tabla 11, ambos aislamientos contienen dos plásmidos con un único origen de replicación (IncN e IncFIB) y un plásmido de aproximadamente 200 kb que contiene dos orígenes de replicación (IncFIB(K) e IncFII(K)).

Los aislamientos Kp20 y Kp21 contienen cinco secuencias plasmídicas cada uno, de las cuales dos fueron completamente cerradas. En el caso del aislamiento Kp23, se identificaron seis secuencias plasmídicas, y solo 3 de ellas se obtuvo en forma cerrada. Los 3 aislamientos presentaron plásmidos que contienen dos o más orígenes de replicación, (plásmidos multirreplicones). En todos los aislamientos se puede observar secuencias plasmídicas cuyos orígenes de replicación no se pudieron identificar. Diversos estudios han reportado la presencia de plásmidos sin grupo de incompatibilidad detectable en genomas de *Kp*. Las posibles causas incluyen la obtención de plásmidos incompletos o que no están cerrados, lo que impide la identificación del origen de replicación, así como la existencia de orígenes de replicación que aún no están caracterizados y/o incorporados en las bases de datos disponibles (W. Li et al., 2022).

Todos los aislamientos presentaron plásmidos pertenecientes a los grupos de incompatibilidad comúnmente descriptos en enterobacterias (Carattoli, 2009). La presencia de plásmidos multirreplicones es de gran interés, se ha descrito que estos plásmidos surgen de la fusión de dos o más plásmidos simples, proporcionando una gran adaptabilidad en los entornos clínicos y aumentando la capacidad de los aislamientos resistentes de diseminarse (X. Wang et al., 2021). Se sabe que los distintos orígenes de replicación tienen rangos de hospederos determinados, y que la presencia de más de uno en un plásmido amplía el rango de hospedero que pueden alojar el plásmido mejorando la eficiencia de su movilización (Rozwandowicz et al., 2018).

Algo interesante que se observa es que los plásmidos de gran tamaño (>100Kpb) tiene un %G+C igual o menor que los plásmidos más pequeños. Los plásmidos multirreplicones de gran tamaño portan una gran cantidad de genes de resistencia (más de 5), su valor bajo de G+C favorece su permanencia en la célula porque permite disminuir el costo asociado a la carga de plásmidos (Yano et al., 2019).

### 1.3.3 Factores de virulencia

Todos los aislamientos presentaron genes de virulencia de localización cromosómica (Tabla 12). No se detectó ningún factor de virulencia plásmido. Se destaca la presencia de genes que codifican para fimbrias de tipo 1 y tipo 3, asociadas con la producción de biofilm. Entre los genes involucrados en la captación de hierro, se encuentran el gen *iutA*, relacionado con el sideróforo aerobactina, y los genes *iroE* e *iroN*, que forman parte del sistema del sideróforo salmochelina. Además, se identificaron los genes asociados con la biosíntesis (*ent*) y el transporte (*fep* y *fes*) del sideróforo enterobactina, un potente sistema de captura de hierro crucial para el crecimiento bacteriano en condiciones de limitación de este elemento (Paczosa & Mecsas, 2016). No se detectaron genes de virulencia relacionados con la hipermucoviscosidad, como *rmpA* y *rmpA2*, los cuales son típicamente responsables de la producción excesiva de cápsula, una característica clave de las cepas hipervirulentas de *Kp* (Chang et al., 2013).

**Tabla 12.** Factores de virulencia presentes en los aislamientos secuenciados

| Aislamiento                 | 54-1                                 | 54-2                                  | Kp20                                  | Kp21                                  | Kp23                                  |
|-----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Adherencia                  | Fimbria tipo 3<br><i>mrkABCDFHIJ</i> | Fimbria tipo 3<br><i>mrkABCDFHIJ</i>  | Fimbria tipo 3<br><i>mrkABCDFHIJ</i>  | Fimbria tipo 3<br><i>mrkABCDFHIJ</i>  | Fimbria tipo 3<br><i>mrkABCDFHIJ</i>  |
|                             | Fimbria tipo 1<br><i>fimABCDEFK</i>  | Fimbria tipo 1<br><i>fimABCDEFHIK</i> | Fimbria tipo 1<br><i>fimABCDEFHIK</i> | Fimbria tipo 1<br><i>fimABCDEFHIK</i> | Fimbria tipo 1<br><i>fimABCDEFHIK</i> |
| Bomba de eflujo             | <i>AcrAB</i>                         | <i>AcrAB</i>                          | <i>AcrAB</i>                          | <i>AcrAB</i>                          | <i>AcrAB</i>                          |
| Aerobactina                 | <i>iutA</i>                          | <i>iutA</i>                           | <i>iutA</i>                           | <i>iutA</i>                           | <i>iutA</i>                           |
| Enterobactina               | <i>entABCDEF</i>                     | <i>entABCDEF</i>                      | <i>entABCDEF</i>                      | <i>entABCDEF</i>                      | <i>entABCDEF</i>                      |
|                             | <i>fepABCDG</i>                      | <i>fepABCDG</i>                       | <i>fepABCDG</i>                       | <i>fepABCDG</i>                       | <i>fepABCDG</i>                       |
|                             | <i>fes</i>                           | <i>fes</i>                            | <i>fes</i>                            | <i>fes</i>                            | <i>fes</i>                            |
| Salmoquelina                | <i>iroEN</i>                         | <i>iroEN</i>                          | <i>iroEN</i>                          | <i>iroEN</i>                          | <i>iroEN</i>                          |
| Regulación                  | <i>RcsAB</i>                         | <i>RcsAB</i>                          | <i>RcsAB</i>                          | <i>RcsAB</i>                          | <i>RcsAB</i>                          |
| Sistema de secreción tipo 6 | <i>tssABCDFGHJKL</i>                 | <i>tssABCDFGHJKL</i>                  | <i>tssABCDFGHJKL</i>                  | <i>tssABCDFGHJKL</i>                  | <i>tssABCDFGHJKL</i>                  |
|                             | <i>ompA</i>                          | <i>ompA</i>                           | <i>ompA</i>                           | <i>ompA</i>                           | <i>ompA</i>                           |
| Resistencia al suero        | LPS <i>rfb</i> locus                 | LPS <i>rfb</i> locus                  | LPS <i>rfb</i> locus                  | LPS <i>rfb</i> locus                  | LPS <i>rfb</i> locus                  |

Aclaraciones: Los factores de virulencia que se muestran en la tabla fueron detectados por las bases de datos VFDB, Kleborate y BiGsd.

El *String Test* fue negativo para todos los aislamientos, lo que está de acuerdo con la ausencia de genes relacionados con el fenotipo hipermucoviscoso (Hagiya et al., 2014). Si bien los aislamientos en este estudio tienen una amplia resistencia a los antibióticos detectándose incluso un fenotipo pan resistente, no se detectaron factores de virulencia relacionados con fenotipos hipervirulentos. Por otro lado, los factores de virulencia detectados se corresponden con los encontrados en aislamientos clínico causante de infección (B. Li et al., 2014).

### 1.3.4 Análisis MLST y tipo capsular

El estudio de MLST reveló que los aislamientos 54-1 y 54-2 pertenecen al secuenciotipo ST437, perteneciente al complejo clonal 258. Los aislamientos productores de NDM fueron clasificados como ST307. En cuanto al tipo capsular, los aislamientos 54-1 y 54-2 presentaron el tipo KL36 y el alelo 109 del gen *wzi*. Por otro lado, los aislamientos Kp20, Kp21 y Kp23 mostraron el tipo capsular KL102 y el alelo 173 del gen *wzi* (Tabla 13).

**Tabla 13.** Características genéticas de los aislamientos secuenciados.

| Aislamiento            | 54-1           | 54-2           | Kp20           | Kp21           | Kp23           |
|------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| MLST                   | ST437          | ST437          | ST307          | ST307          | ST307          |
| K Locus ( <i>wzi</i> ) | <i>wzi</i> 109 | <i>wzi</i> 109 | <i>wzi</i> 173 | <i>wzi</i> 173 | <i>wzi</i> 173 |
| Tipo capsular          | KL36           | KL36           | KL102          | KL102          | KL102          |
| O LOCUS                | O4             | O4             | O1/O2v2        | O1/O2v2        | O1/O2v2        |

MLST: *Multilocus sequence type*.

En nuestro país, la mayoría de los aislamientos de *Kp* productores de carbapenemasa han sido pertenecientes al secuenciotipo ST258 o secuenciotipos relacionados pertenecientes al CC258 (García-Fulgueiras et al., 2020). Sin embargo, el clon ST307 ha sido reportada recientemente en los países de América Latina asociada a cepas multirresistentes, productora de distintos tipos de carbapenemasas (Núñez-Samudio et al., 2022) (González-Espinosa et al., 2024). Este clon se considera de alto riesgo debido a su gran capacidad de diseminarse y de adquirir múltiples genes de resistencia (Wyres et al., 2019). Su éxito le ha permitido desplazar a otras clonas internacionales de alto riesgo en varias regiones, incluyendo a Colombia entre los países de América Latina donde ha sido identificado como un clon endémico (Peirano et al., 2020). La detección de este clon de alto riesgo en Uruguay resulta preocupante, ya que evidencia su diseminación regional. Estos resultados resaltan la importancia de los estudios genómicos en los aislamientos clínicos y

subrayan la necesidad de implementar estrategias de vigilancia activa que permitan contener la propagación en el ambiente hospitalario. Sería de importancia ampliar el estudio con un número representativo de aislamientos de *Kp* en el país para evaluar si el clon ST307 está ganando terreno en Uruguay y determinar si al igual que ha sucedido en otros países, está ocurriendo un reemplazo del clon ST258.

## 2. Correlación del perfil de resistencia con el genotipo de resistencia

En este estudio, se evaluaron cinco aislamientos de *Kp*, dos de los cuales 54-1 y 54-2 son productores de KPC y corresponden a un brote hospitalario del año 2011, mientras que los otros tres (Kp20, Kp21 y Kp23) son productores de NDM y fueron aislados en diferentes centros de salud en el año 2023.

Los aislamientos 54-1 y 54-2 portan el gen de carbapenemasa *bla*<sub>KPC-2</sub>. La diferencia en el valor de la CIM a los  $\beta$ -lactámicos en estos aislamientos, se puede explicar por la presencia de la BLEE CTX-M-15 en 54-2, que le confiere niveles más alto de resistencia a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación.

Los aislamientos Kp20, Kp21 y Kp23, comparten el gen *bla*<sub>NDM-5</sub>. Estos aislamientos presentan valores de CIM similares a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, siendo el aislamiento Kp21 el que se muestra con valores más bajos, sugiriendo quizás una menor expresión de la enzima o de porinas y bombas de eflujo. La cepa Kp23 es el único de este grupo que presenta resistencia al aztreonam. En *Kp* la resistencia a este antibiótico puede estar mediada por múltiples mecanismos, como ser, delección o mutación de porinas, el aumento en la expresión de bombas de eflujo, la producción de BLEE, AmpC o de KPC, o incluso una combinación sinérgica de estos mecanismos. Aunque las mutaciones en *ompK37* y *ompK38* son idénticas en estos aislamientos, la presencia de CTX-M-15 y CTX-M-172, en el aislamiento Kp23, son el principal determinante de su resistencia al aztreonam.

Todos los aislamientos albergan genes de resistencia a aminoglucósidos: *aadA2*, *aac(3)-IIId*, *aph(3')-Ia*, *aph(3')-Ib*, *aph(6')-Id*, *aac(6')-Ib-cr* y *rmtB*. Los genes *aadA2*, *aph(3')-Ia*, *aph(3')-Ib*, *aph(6')-Id*, codifican para enzimas modificadoras que inactivan a los aminoglucósidos, pero su especificidad está dada para ciertas moléculas como son kanamicina, neomicina, streptomina y espectinomicina (Lin et al., 2024). Se ha descrito que aislamientos que presentan estos genes son igualmente sensibles a gentamicina y/o amicacina (El-Gebaly et al., 2021). Por otro lado, el gen *rmtB* en *Kp* codifica una metiltransferasa que modifica el ARN ribosómico 16S, confiriendo resistencia de alto nivel a varios aminoglucósidos, incluyendo amicacina, tobramicina y gentamicina (Sabtcheva et al., 2024), lo que podría explicar la resistencia a amicacina y gentamicina en Kp20, Kp21 y Kp23. De forma adicional, Kp23, 54-1 y 54-2 porta el gene *aac(6')-Ib-cr* que codifica una variante de la enzima acetiltransferasa: aminoglucósido 6'-N-

acetiltransferasa. Esta enzima confiere resistencia a kanamicina, amicacina y tobramicina, así como también, reduce la sensibilidad a algunas fluoroquinolonas, como ciprofloxacina y norfloxacina (Vaziri et al., 2020). Sin embargo, 54-1 y 54-2 son sensibles a la amicacina y resistentes a gentamicina. La resistencia a gentamicina en estos aislamientos podría deberse principalmente al gen *aac(3)-IId*. En la literatura se han reportado casos de *Kp* portadoras del gen *aac(6')-Ib-cr* que presentan susceptibilidad intermedia a amikacina (Díaz Q et al., 2004). Esto podría explicarse por mutaciones en la enzima que da lugar a alteración en el perfil de actividad de la misma, como demostraron Casin y col (Casin et al., 1998).

Por otro lado, en todos los aislamientos la resistencia a ciprofloxacina esta respaldada en los genomas tanto por la presencia de la bomba de eflujo OqxAB como por las mutaciones puntuales en los genes *gyrA* y *parC*. Se ha descrito que la presencia de OqxAB contribuyen a bajos niveles de resistencia a las quinolonas en *Kp* (Rodriguez-Martinez et al., 2013), Sin embargo, las mutaciones en *gyrA* y *parC*, son la causa más frecuente de resistencia. Las mutaciones encontradas en estos aislamientos son las más frecuentemente reportadas en *Kp* resistente a quinolonas: Ser83→Phe, Asp87→Ala en *gyrA* y Ser 80→Ile en *parC* (Rezaei et al., 2024). En Kp23, 54-1 y 54-2 la presencia del gen plasmídico de resistencia a quinolonas *qnrB1* y el gen *aac(6')-Ib-cr* pueden estar contribuyendo a la resistencia a ciprofloxacina en estos aislamientos.

Todos los aislamientos presentan niveles altos de resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol, correlacionándose con la presencia en todos ellos de las variantes de los genes *sul* y *dfrA*. Estos genes se encuentran generalmente en secuencias móviles y su presencia permite la síntesis de ácido fólico en presencia del antibiótico, y se ha demostrado que su combinación genera resistencia de alto nivel al trimetoprim/sulfametoxazol. Varios estudios han demostrado que la resistencia al trimetoprim/sulfametoxazol es alta en *Kp* productora de carbapenemasa (Luterbach et al., 2019), (Murri et al., 2017).

En cuanto a la susceptibilidad a colistina, los aislamientos 54-1 y 54-2 mostraron ser sensibles mientras que Kp20, Kp21 y Kp23 fueron resistentes (Tabla 14). El gen plasmídico *mcr* no se identificó en ninguno de los aislamientos, por lo que se descartó un mecanismo de resistencia plasmídico. Este resultado está de acuerdo con lo reportado por el Ministerio de Salud Pública del año 2024 donde se reporta que la resistencia a colistina en *Kp* en nuestro país no suele ser de

origen plasmídica (Ministerio de Salud Pública., 2024). El análisis de los genes cromosomales involucrados en la resistencia a colistina reveló mutaciones *nonsense* y *missense* en los genes *mcrB*, *pmrA*, *pmrB* y *crrB*. Los aislamientos Kp20, Kp21 y Kp23 presentaron una mutación puntual en el aminoácido Q30 de *mcrB*, que lleva a la aparición de un codón stop y por tanto da como resultado una proteína MgrB truncada. Las mutaciones en *pmrA*, *pmrB* y *crrB* dieron como resultado el cambio de un aminoácido por otro. La mutación en *crrB* Y31H ya ha sido reportada en aislamientos resistentes a colistina (Poirel et al., 2017), mientras que las mutaciones A42T en *pmrA* y L213M en *pmrB* no se han encontrado en la literatura. Los aislamientos Kp16 y Kp22 (aislamientos que no fueron secuenciados) fueron sometidos a PCR para la amplificación de los genes *mcr* y *mcrB*. Al Igual que en el resto de los aislamientos el gen *mcr* no fue encontrado. La secuencia del gen *mcrB* del aislamiento Kp22 reveló la presencia de una secuencia de inserción: IS5-like, mientras que el aislamiento Kp16 presento la mutación en Q30. La mutación en el aminoácido Q30 y la inserción de una secuencia IS-5-like en *mcrB* ya han sido reportadas (Haeili et al., 2017) (Garcia-Fulgueiras et al., 2020). Un estudio determino por ensayo de complementación que estas alteraciones en *mcrB* confieren resistencia a colistina el Kp (Poirel et al., 2015).

**Tabla 14.** Genes relacionados con la resistencia a colistina

| Aislamiento | CIM<br>(µg/mL) | Interpretación | <i>mcr</i> | <i>mcrB</i> | <i>phoP</i> | <i>phoQ</i> | <i>pmrA</i> | <i>pmrB</i> | <i>crrB</i> |
|-------------|----------------|----------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 54-1        | 1              | Sensible       | Ausente    | WT          | WT          | WT          | WT          | WT          | Ausente     |
| 54-2        | 1              | Sensible       | Ausente    | WT          | WT          | WT          | WT          | WT          | Ausente     |
| Kp20        | 128            | Resistente     | Ausente    | Q30*        | WT          | WT          | A42T        | L213M       | Y31H        |
| Kp21        | 32             | Resistente     | Ausente    | Q30*        | WT          | WT          | A42T        | L213M       | Y31H        |
| Kp23        | 16             | Resistente     | Ausente    | Q30*        | WT          | WT          | A42T        | L213M       | Y31H        |
| Kp16        | 32             | Resistente     | Ausente    | Q30*        | -           | -           | -           | -           | -           |
| Kp22        | 32             | Resistente     | Ausente    | IS5-like    | -           | -           | -           | -           | -           |

Referencia: WT: wild tipe; \*: codón stop

El aislamiento Kp23 se distingue por tener un perfil de resistencia más amplio, que incluye resistencia a colistina y aztreonam, por lo que fue categorizado como pan resistente. El valor de CIM a tigeciclina fue de 4 µg/ml (Tabla 1), determinado mediante el sistema automatizado Vitek2. Se ha documentado, que el sistema automatizado Vitek2 arroja una elevada tasa de error en la

determinación de susceptibilidad a tigeciclina en *Kp* en comparación con el método de referencia de microdilución en caldo, especialmente en las cepas con valor de CIM mayor a 2 µg/mL, demostrando sin embargo una buena correlación en cepas con CIM hasta 2 µg/mL. 2 (H. Li et al., 2021)(Lat et al., 2011). Dado que el valor de CIM para Kp23 fue de 4 µg/mL es necesario confirmar este valor por el método de referencia. Aprovechando que se contaba con la secuenciación total del genoma, se investigó la presencia de genes de resistencia a tigeciclina reportados hasta el momento (bomba de eflujo *tetA* y mutaciones puntuales en la bomba AcrAB-TolC y su represor *ramA*) (Chirabhundhu et al., 2024), descartándose la presencia de los mismos.

### 3. Análisis de la relación genética entre los aislamientos

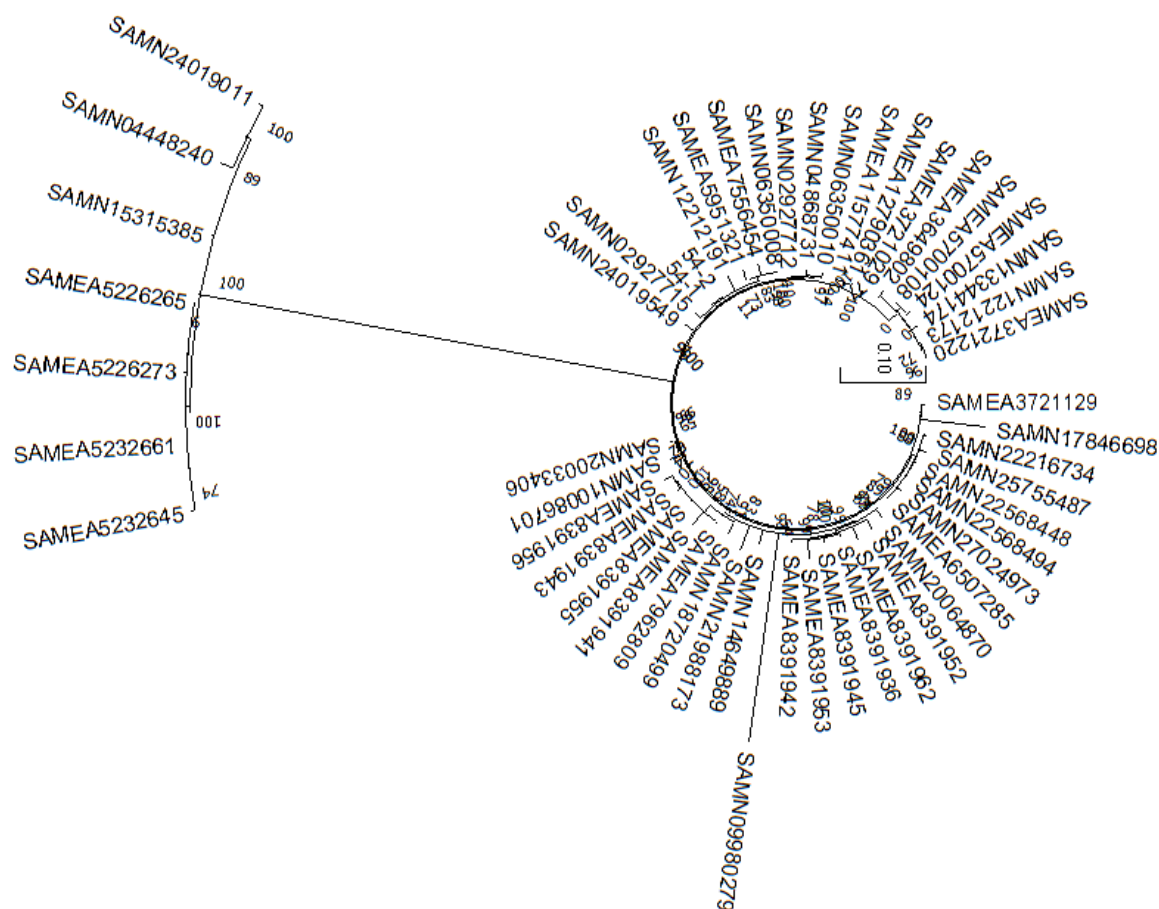
#### 3.1 Análisis del pangenoma secuencias ST437

Para la construcción del árbol filogenético, se incluyeron un total de 53 genomas completos de *Kp*. De estos, 51 fueron descargados de la base de datos *Pathogenwatch*, seleccionados específicamente por pertenecer al secuenciotipo ST437 y representar cepas diferentes (aislamientos provenientes de distintos países, obtenidos en diferentes años y con diferente valor de cgMLST). A estos se sumaron los genomas de los aislamientos propios 54-1 y 54-2 (Figura 3).

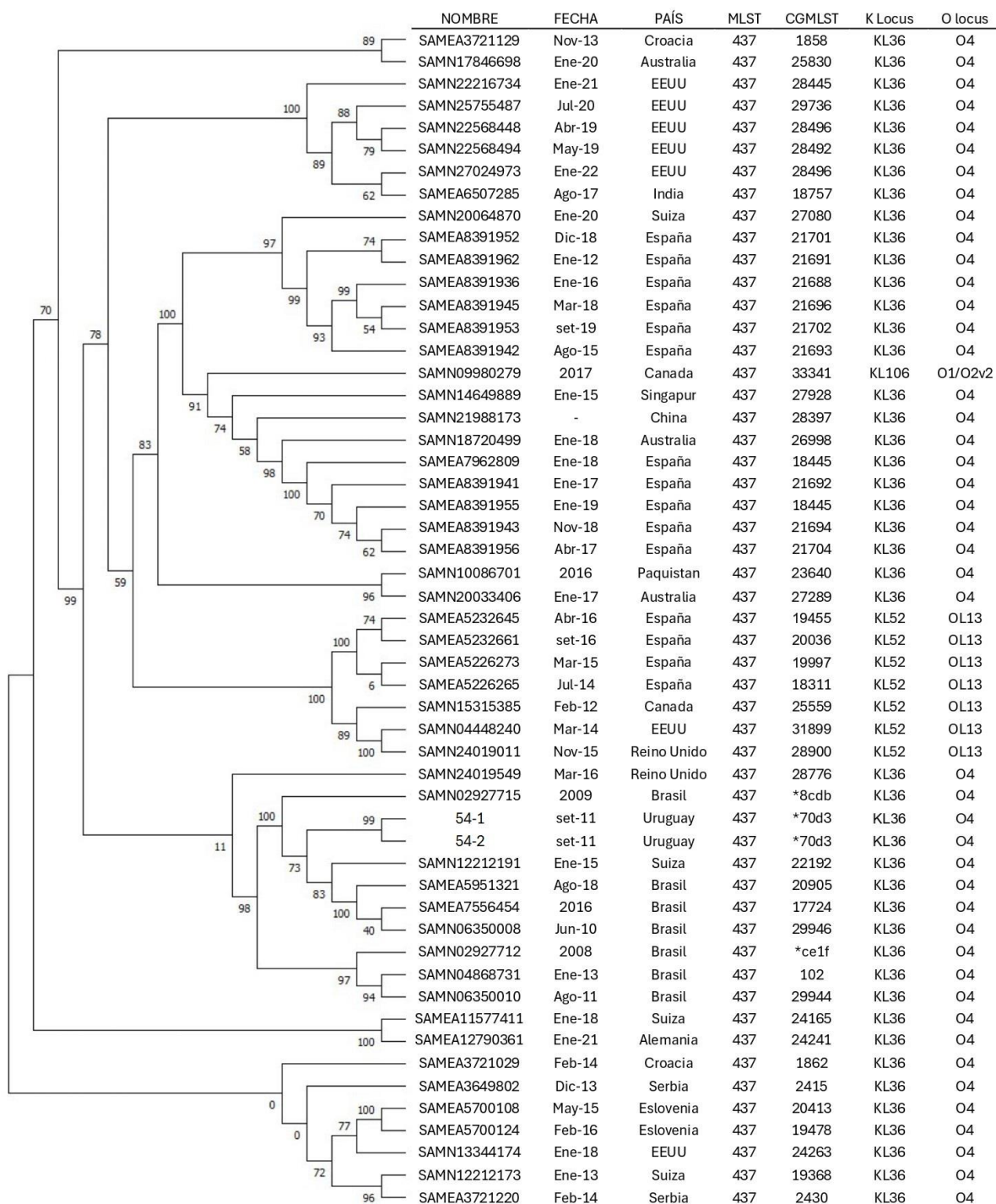
El análisis genómico de los 53 genomas reveló la presencia de 9111 genes en total. De estos, 4314 genes constituyeron el *core genome*, es decir, aquellos genes compartidos por todos los genomas en el análisis. Adicionalmente, se identificaron 5207 SNPs, que fueron utilizados para inferir las relaciones filogenéticas entre los aislamientos.

El árbol filogenético obtenido para el secuenciotipo ST437 muestra la formación de dos clados distintos. La mayoría de los genomas, incluyendo los aislamientos 54-1 y 54-2, se agrupan en el primer clado (Clado 1), mientras que un grupo menor de genomas se encuentra en un segundo clado (Clado 2). El análisis de los genomas pertenecientes al clado 2 mostró que todos comparten un perfil distintivo en sus antígenos capsulares y de lipopolisacáridos (LPS) en comparación con los genomas del clado 1. Esto parece estar determinado por variaciones en el locus *K* (síntesis de cápsula) y el locus *O* (estructura del LPS) (Figura 4 y Tabla 15). Esta observación es coherente con estudios previos que muestran una diversificación filogenética significativa en estos loci (DeLeo et al., 2014) (Wyres et al., 2015).

Además, el árbol filogenético (Figuras 3 y 4) ubica a los aislamientos 54-1 y 54-2 junto a los genomas de aislamientos provenientes de Brasil, indicando una estrecha relación genética. Esta proximidad es coherente con el contexto geográfico, dado que Brasil comparte fronteras con Uruguay, lo que sugiere un posible origen del secuenciotipo en la región.



**Figura 3.** Árbol filogenético basado en los SNPs del genoma *core* de 53 secuencias genómicas de *Kp* ST437. El análisis incluye los genomas de los aislamientos 54-1 y 54-2, así como 51 genomas descargados de la base de datos Pathogenwatch, correspondientes a aislamientos de distintas cepas caracterizadas por diferentes años, regiones geográficas y perfiles cgMLST.



**Figura 4.** Características demográficas y genómicas de los genomas de *Kp* ST437 y su relación filogenética.

**Tabla 15.** Genes de resistencia de los genomas de *Kp* ST437 utilizados para la construcción del árbol filogenético.

| Genoma       | Carbapenemasa | BLEE     | <i>qnrB1</i> | <i>aac(6')-Ib-cr</i> | <i>aac(3)-II</i> | <i>aac(6')-Ib</i> | <i>aadA</i> | <i>aph(3')</i> | <i>tet</i> | <i>dfrA</i> |
|--------------|---------------|----------|--------------|----------------------|------------------|-------------------|-------------|----------------|------------|-------------|
| SAMEA3721129 |               |          |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN17846698 |               | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN22216734 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN25755487 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN22568448 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN22568494 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN27024973 | OXA-48        | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA6507285 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN20064870 | OXA-48        |          |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA8391952 |               | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA8391962 |               |          |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA8391936 | OXA-48        |          |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA8391945 | OXA-48        |          |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA8391953 | OXA-48        | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA8391942 |               |          |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN09980279 | KPC-2         |          |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN14649889 | KPC-2         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN21988173 | KPC-2         |          |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN18720499 |               |          |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA7962809 |               | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA8391941 | NDM-1/ OXA-48 | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA8391955 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA8391943 | NDM-1/OXA-48  | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA8391956 | NDM-1/ OXA-48 | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN10086701 | OXA-48        | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN20033406 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA5232645 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA5232661 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA5226273 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMEA5226265 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN15315385 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN04448240 | NDM-1         | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN24019011 |               | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN24019549 |               | CTX-M-15 |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| SAMN02927715 | KPC-2         |          |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |
| 54-1         | KPC-2         |          |              |                      |                  |                   |             |                |            |             |

|               |               |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|---------------|---------------|----------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 54-2          | KPC-2         | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMN12212191  | KPC-2         | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMEA5951321  | KPC-2         | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMEA7556454  | KPC-2         | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMN06350008  | KPC-2         | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMN02927712  | KPC-2         |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMN04868731  | KPC-2         |          |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMN06350010  | KPC-2         | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMEA11577411 |               | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMEA12790361 |               | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMEA3721029  |               | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMEA3649802  | NDM-1         | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMEA5700108  | NDM-1/ OXA-48 | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMEA5700124  |               | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMN13344174  | OXA-48        | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMN12212173  | NDM-1         | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| SAMEA3721220  | NDM-1         | CTX-M-15 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

Aclaraciones: Se muestra en color verde cuando el gen está presente y en blanco cuando está ausente.

Los aislamientos 54-1 y 54-2 presentan solo 6 SNPs de diferencia en su genoma *core* (Tabla 16), lo que indica una relación clonal muy estrecha. Dado que ambos fueron obtenidos del mismo paciente, en el mismo sitio de infección y en el mismo momento, estos resultados sugieren fuertemente que pertenecen a la misma cepa. Esta baja variabilidad genómica es consistente con eventos de infección persistente o diseminación clonal dentro del huésped, como se ha descrito en estudios previos sobre *Kp* en entornos clínicos (Wylie et al., 2019).

**Tabla 16.** Matriz basada en la diferencia de la cantidad de SNPs en el genoma núcleo.

|      | 54-1 | 54-2 |
|------|------|------|
| 54-1 | 0    | 6    |
| 54-2 |      | 0    |

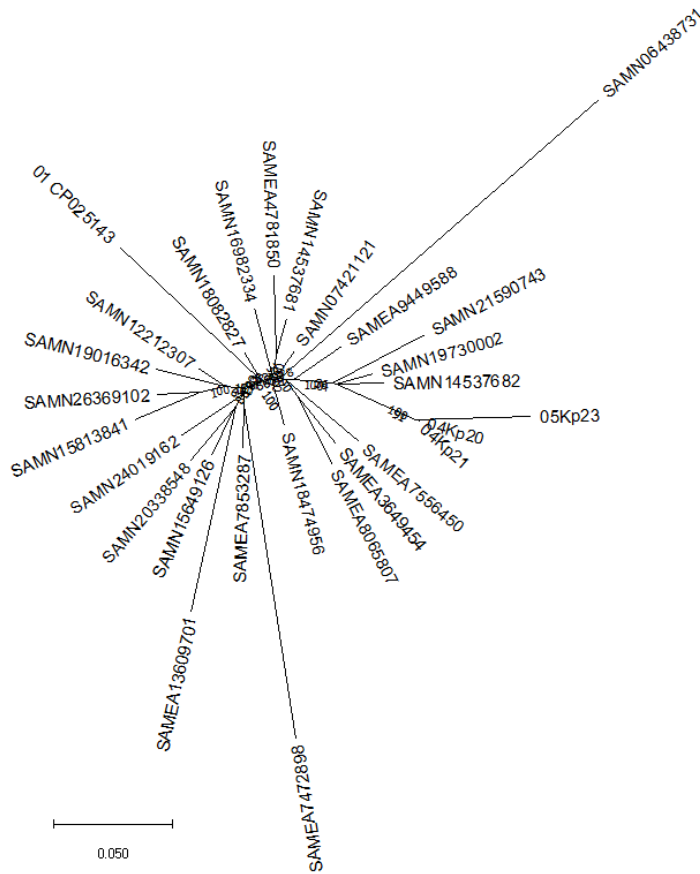
#### 4.2 Análisis del pangenoma secuencias ST307

Se construyó un árbol filogenético, donde se incluyeron un total de 28 genomas completos de *Kp* ST307. De estos, 25 fueron descargados de la base de datos *Pathogenwatch*, seleccionados específicamente por pertenecer al secuenciotipo ST307 y representar cepas diferentes (aislamientos provenientes de distintos países, obtenidos en diferentes años y con diferente valor de cgMLST). A estos se sumaron los genomas de los aislamientos propios Kp20, Kp21 y Kp23. El árbol y las características de los genomas se muestran en las figuras 5 y 6.

El análisis genómico de los 28 genomas reveló la presencia de 7811 genes en total. De estos, 4489 genes constituyeron el *core genoma*. Adicionalmente, se identificaron 1715 SNPs, que fueron utilizados para inferir las relaciones filogenéticas entre los aislamientos.

Al observar el árbol (Figura 5) se puede ver que la distribución de los genomas es homogénea, y todos ellos se agrupan en un único clado. Además, teniendo en cuenta las características de los genomas que se muestran en la Figura 6 y la Tabla 18, se puede observar que todos ellos comparten el mismo tipo capsular y de LPS, sin embargo, albergan distintos tipos de carbapenemasa y múltiples genes de resistencia. Los aislamientos en estudio se agrupan juntos, y su relación más cercana se da con el genoma de un aislamiento perteneciente a Argentina, del año 2017.

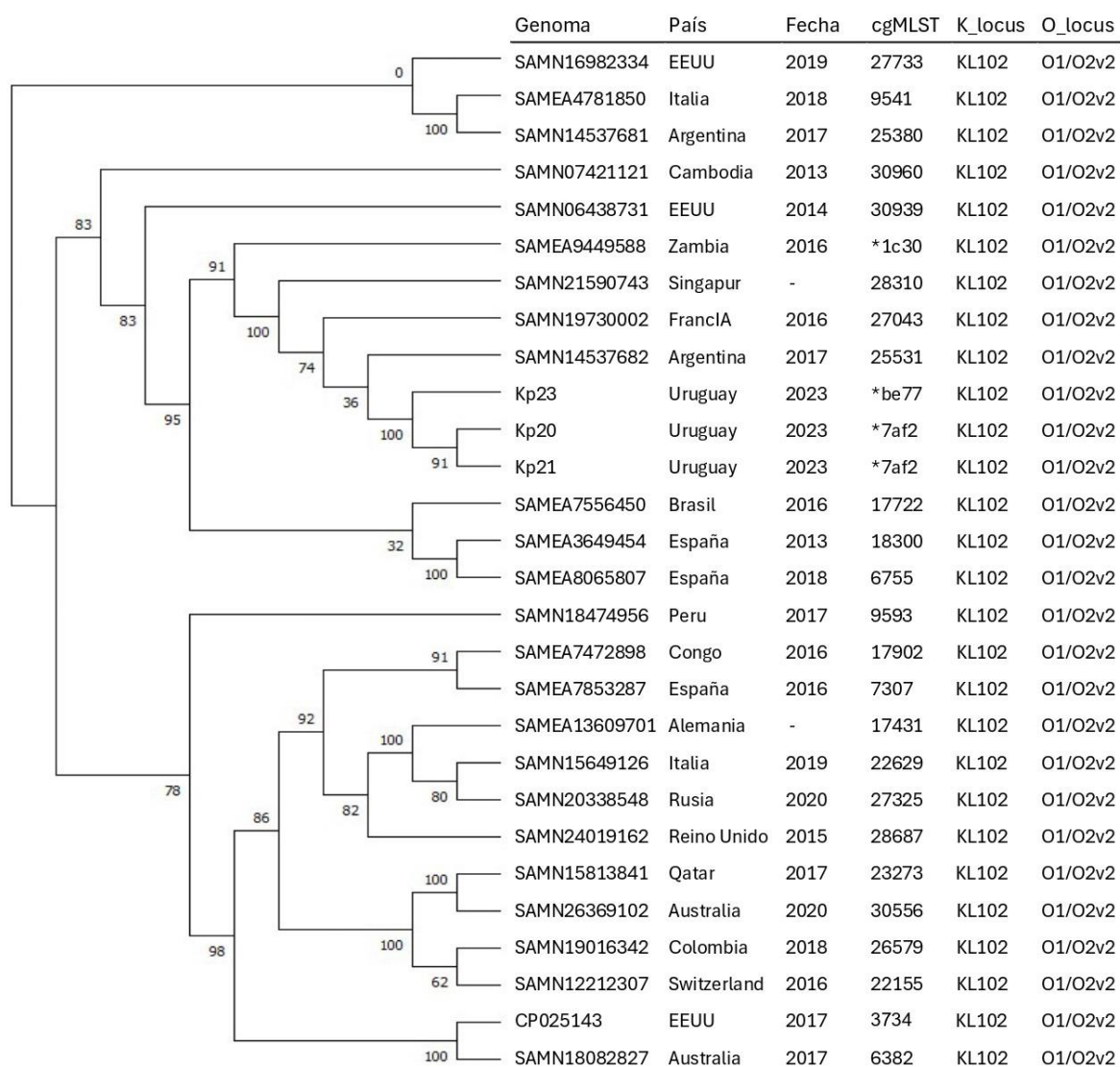
Al evaluar la cantidad de SNPs, se observa que Kp20 y Kp21 presentan una diferencia de solo 4 SNPs entre sí, mientras que ambos difieren en 74 y 77 SNPs con Kp23, respectivamente (Tabla 17). Además, Kp20 y Kp21 comparten el mismo perfil de cgMLST (\*7af2), en contraste con Kp23, que exhibe un perfil distinto (\*be77). Estos resultados, tanto en la variabilidad de SNPs como en el perfil de cgMLST, respaldan que Kp20 y Kp21 pertenecen a la misma clona, mientras que Kp23 corresponde a un clon diferente. Estos resultados son consistentes con el hecho de que Kp20 y Kp21 provienen del mismo centro de salud, y Kp23 pertenece a un centro diferente.



**Figura 5.** Árbol filogenético basado en los SNPs del “core” genome de 28 secuencias genómicas de *Kp* ST307. El análisis incluye los genomas de los aislamientos Kp20, Kp21 y Kp23, así como 25 genomas descargados de la base de datos Pathogenwatch, correspondientes a aislamientos de distintas cepas caracterizadas por diferentes años, regiones geográficas y perfiles cgMLST.

**Tabla 17.** Matriz basada en la diferencia de la cantidad de SNPs en el genoma núcleo.

|              | Kp20 | Kp21 | Kp23 | SAMN14537682 |
|--------------|------|------|------|--------------|
| Kp20         | 0    | 4    | 77   | 94           |
| Kp21         |      | 0    | 75   | 92           |
| K23          |      |      | 0    | 163          |
| SAMN14537682 |      |      |      | 0            |



**Figura 6.** Características demográficas y genómicas de los genomas de *Kp* ST307 y su relación filogenética.

**Tabla 18.** Genes de resistencia de los genomas de *Kp* ST307 utilizados para la construcción del árbol filogenético.

| Genoma        | Carbapenemasa | BLEE                | <i>aac(6')-Ib</i> | <i>aac(6')-Ib-cr</i> | <i>aadA</i> | <i>rmtB</i> | <i>qnrB1</i> | <i>sul1</i> | <i>sul2</i> | <i>tet(A)</i> | <i>dfrA12</i> | <i>dfrA14</i> | <i>GyrA-83I</i> | <i>GyrA-87N</i> | <i>ParC-80I</i> |
|---------------|---------------|---------------------|-------------------|----------------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| SAMN16982334  | KPC-2         | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMEA4781850  | KPC-2         |                     |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN14537681  | KPC-3         |                     |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN07421121  |               | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN06438731  | KPC-2         | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMEA9449588  |               | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN21590743  | NDM-1         | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN19730002  | NDM-1         | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN14537682  | KPC-2         | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| Kp23          | NDM-5         | CTX-M-15 / CTX-M172 |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| Kp20          | NDM-5         |                     |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| Kp21          | NDM-5         |                     |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMEA7556450  |               | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMEA3649454  |               | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMEA8065807  | OXA-48        | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN18474956  |               | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMEA7472898  |               | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMEA7853287  | KPC-3         | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMEA13609701 | OXA-48        | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN15649126  | KPC-3         | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN20338548  |               |                     |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN24019162  | NDM-1         | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN15813841  |               | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN26369102  |               | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN19016342  | KPC-2         | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN12212307  |               | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| CP025143      | KPC-2         | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |
| SAMN18082827  |               | CTX-M-15            |                   |                      |             |             |              |             |             |               |               |               |                 |                 |                 |

Aclaraciones: Se muestra en color verde cuando el gen está presente y en blanco cuando está ausente.

#### 4. Análisis de plataformas genéticas plasmídicas

##### 4.1 Comparación del contenido plasmídico de los aislamientos productores de KPC-2

Los aislamientos 54-1 y 54-2 fueron obtenidos simultáneamente de la herida quirúrgica del paciente, pertenecieron al mismo cgMLST y presentaron una diferencia de solo 6 SNPs, fueron así mismo analizados en su contenido plasmídico.

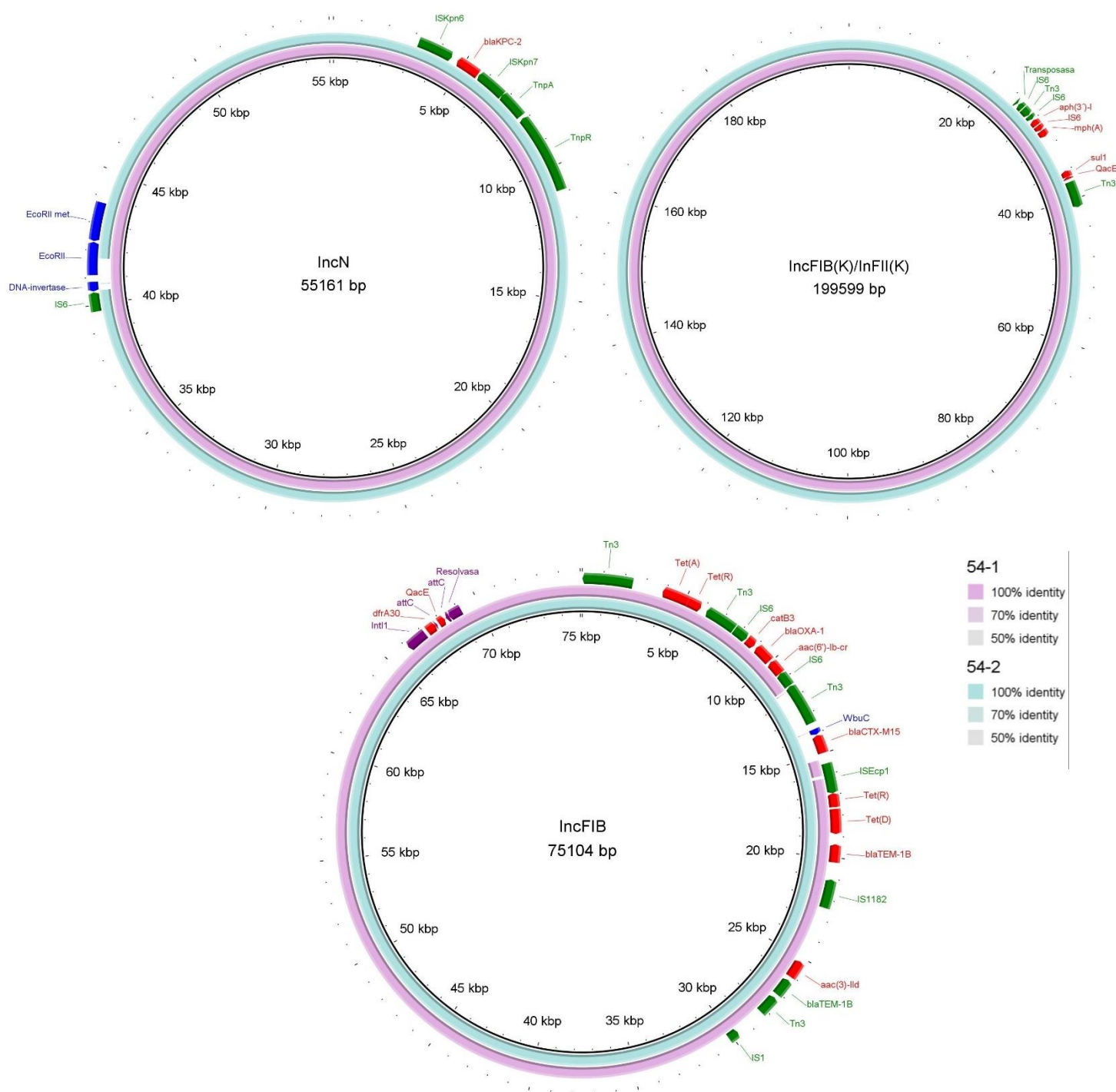
Ambos aislamientos contienen tres plásmidos de tamaños similares y pertenecientes a los mismos grupos de incompatibilidad IncFIB(K)/IncFII(K), IncFIB y IncN (Tabla 19). Se observa que el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> está presente en ambos aislamientos en un plásmido IncN de 53 kb, alojado en el transposón Tn4044. Ambos plásmidos comparten 99.99 % de identidad y tienen una cobertura del 97%. (Figura 7). El pequeño fragmento no homólogo de 1200pb no contiene genes de resistencia (invertasa-DNA/endonucleasa EcoRII) y esta precedido por una secuencia de inserción tipo IS6-like. Está demostrado que la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos en el ambiente hospitalario favorece la creación de plásmidos con plataformas genéticas complejas con alto contenido de genes de resistencia asociados a elementos genéticos móviles (Eikmeyer et al., 2012). En este sentido llama la atención que este plásmido siendo de origen hospitalario, presente una plataforma genética sencilla con un único gen de resistencia (*bla*<sub>KPC-2</sub>), asemejándose a plásmidos IncN de origen ambiental.

Sin embargo, los plásmidos IncFIB contienen una estructura compleja que porta múltiples genes de resistencia a antibióticos, los cuales se encuentran en una región de aproximadamente 30 kb, caracterizada por una alta cantidad de secuencias de inserción, en particular Tn3 e IS6, lo que evidencia múltiples eventos de adquisición génica. Los plásmidos IncFIB presentan una cobertura del 99% y una identidad del 100%. La comparación de estos plásmidos revela una región no homóloga de aproximadamente 5 kb ubicada dentro de la zona de resistencia a múltiples drogas (RMD). Esta región no homóloga corresponde a la secuencia donde se encuentra el gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 en el aislamiento 54-2, mientras que está ausente en 54-1. El entorno genético del CTX-M-15 está compuesto por ISEcp1/*bla*<sub>CTX-M-15</sub>/wbuC/Tn3/IS6-like. Como se puede observar en la figura 7, el plásmido IncFIB en el aislamiento 54-1 comprende un ISEcp1 fragmentado lo que sugiere la pérdida *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en dicho aislamiento.

Los plásmidos IncFIB(K)/IncFII(K) presentan una extensión de aproximadamente 200 kb. Estos plásmidos presentan una cobertura del 100% y una identidad del 99,9%, siendo prácticamente idénticos. Un aspecto llamativo es que, a pesar de su gran tamaño, portan tan solo 3 de genes de resistencia que no son de interés clínico: *sul1*, que confiere resistencia a las sulfonamidas, *mph(A)* que confiere resistencia a macrólidos, antibióticos que no se usan clínicamente para tratar infecciones causadas por estos patógenos. y *aph(3')-Ia* que confiere resistencia a kanamicina y neomicina, antimicrobianos que no se usan a nivel clínico. No obstante, la presencia de varios elementos genéticos móviles podría favorecer la adquisición de genes de resistencia y la presencia de dos orígenes de replicación favorece su replicación y estabilidad en la célula huésped.

**Tabla 19.** Plásmidos resistentes a antibióticos de relevancia clínica de los aislamientos ST437

|      | Grupo de incompatibilidad | Contenido GC (%) | Largo (pb) | N genes de resistencia | Genes de resistencia                                                                                                                                                                |
|------|---------------------------|------------------|------------|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 54-1 | IncFIB(K)/IncFII(K)       | 52,8             | 199.521    | 3                      | <i>sul1</i> <i>mph(A)</i> <i>aph(3')-Ia</i>                                                                                                                                         |
|      | IncFIB(pQil)              | 54,2             | 69.570     | 8                      | <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i> <i>aac(3)-IIId</i> <i>dfrA30</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> <i>tet(A)</i> <i>tet(D)</i> <i>catB3</i>                               |
|      | IncN                      | 52,9             | 55.144     | 1                      | <i>bla<sub>KPC-2</sub></i>                                                                                                                                                          |
| 54-2 | IncFIB(K)/IncFII(K)       | 52,8             | 200.720    | 3                      | <i>sul1</i> <i>mph(A)</i> <i>aph(3')-Ia</i>                                                                                                                                         |
|      | IncFIB(pQil)              | 52,4             | 75.085     | 9                      | <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i> <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> <i>aac(3)-IIId</i> <i>dfrA30</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> <i>tet(A)</i> <i>tet(D)</i> <i>catB3</i> |
|      | IncN                      | 53,1             | 53.942     | 1                      | <i>bla<sub>KPC-2</sub></i>                                                                                                                                                          |



**Figura 7.** Representación gráfica de los plásmidos de los aislamientos ST437. En celeste se muestra la secuencia perteneciente al aislamiento 54-2 y en rosado la secuencia perteneciente al aislamiento 54-1. En rojo genes de resistencia a antibióticos, en verde secuencias de inserción, en violeta los componentes de integron y en azul otros genes.

#### 4.2 Análisis del contenido plasmídico de los aislamientos ST307 productores de NDM-5

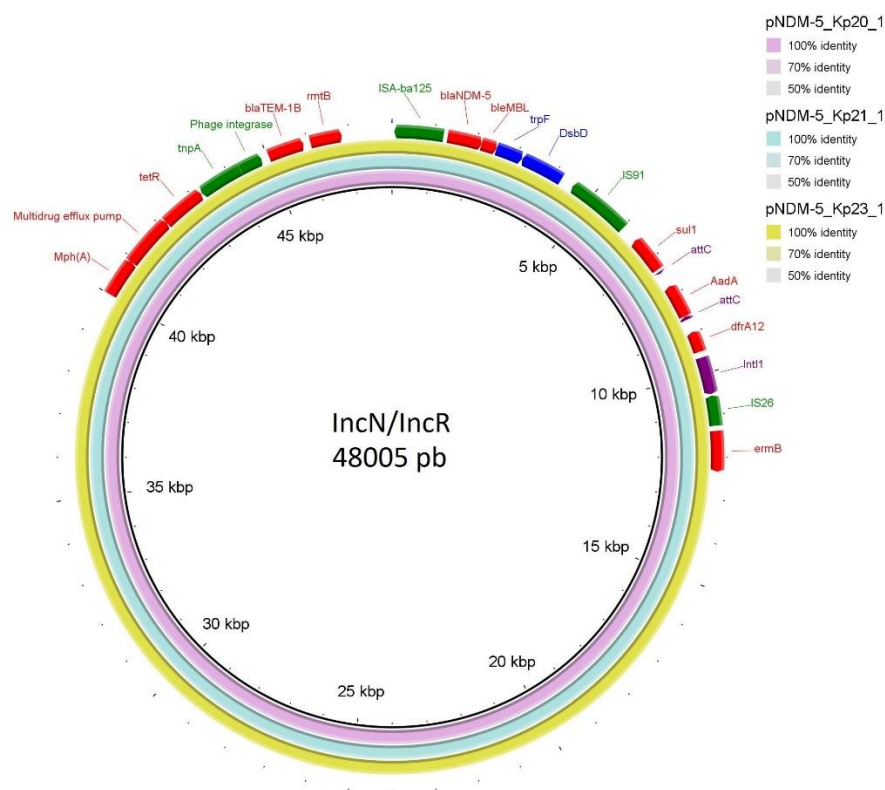
Los aislamientos Kp20, Kp21 y Kp23 presentaron plásmidos pertenecientes a distintos grupos de incompatibilidad y con múltiples orígenes de replicación. Los plásmidos IncR/IncN y IncFIB(K)/IncFII fueron detectados en los tres aislamientos. Además, el aislamiento Kp23 contiene dos plásmidos adicionales, de los cuales uno no presenta grupo de incompatibilidad detectable, mientras que el segundo posee tres orígenes de replicación (IncHI2/IncHI2A/RepA). (Tabla 20). El gen *bla*<sub>NDM-5</sub> fue localizado en los plásmidos IncR/IncN y IncFIB(K)/IncFII en los aislamientos Kp20 y Kp21 mientras que en Kp23 solo fue encontrado en el plásmido IncR/IncN.

Los plásmidos IncR/IncN comparten un 100% de cobertura y 100% de identidad, siendo idénticos en los 3 aislamientos (Figura 8). Estos plásmidos contienen una región RMD de aproximadamente 20 kb que codifica para varios genes de resistencia, incluido el gen que codifica la carbapenemasa NDM-5 cuyo entorno genético es:  $\Delta$ ISA-*ba125/bla*<sub>NDM-5</sub>/*ble*<sub>MBL</sub>/*trpF*. Esta misma estructura genética se encontró en otros plásmidos codificantes de *bla*<sub>NDM-5</sub> (número de acceso: KT725788, CP095611, CP149828) así como también en un plásmido codificante de *bla*<sub>NDM-1</sub> de un aislamiento clínico de *Kp* resistente a colistina de Uruguay (Garcia-Fulgueiras et al., 2020) (Ver figura 9).

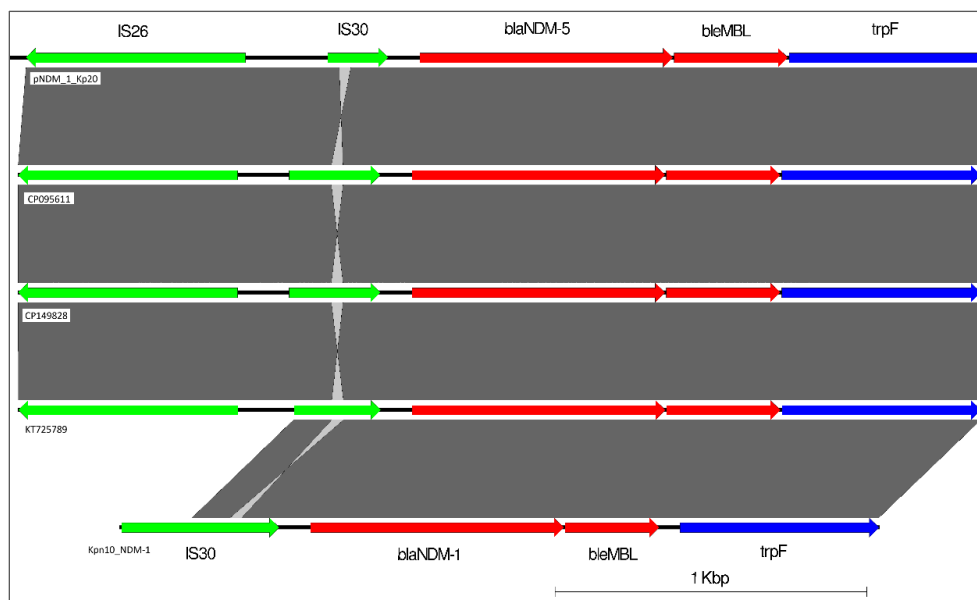
El locus RMD de estos plásmidos está compuesto por múltiples secuencias de inserción (IS26, IS91, IS30, *tnpA*) y diversos genes que confieren resistencia a  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, sulfamidas, trimetoprima y macrólidos. Además, también se puede observar la presencia de una integrasa de fago, y un integron de clase 1. La alta plasticidad de esta región RMD indica varios eventos de adquisición génica, típico de un plásmido que pertenece a un entorno clínico con alta presión selectiva de antibióticos (Baquero et al., 2021).

**Tabla 20.** Plásmidos con genes de resistencia a antibióticos de relevancia clínica de los aislamientos ST307

|      | Nombre           | Grupo de incompatibilidad | GC (%) | Largo (pb) | Nº genes de resistencia |                                                                                                                                                                      |
|------|------------------|---------------------------|--------|------------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kp20 | pNDM-5_Kp20_1    | IncR / IncN               | 54.1   | 48.005     | 8                       | <i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> <i>sul1</i> <i>aadA2</i> <i>dfrA12</i> <i>mph(A)</i> <i>erm(B)</i> <i>rmtB</i>                              |
|      | pNDM-5_Kp20_2    | IncFIB(K)/IncFII          | 52.7   | 237.738    | 10                      | <i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> <i>sul1</i> <i>aadA2</i> <i>dfrA12</i> <i>mph(A)</i> <i>aph(3'')-Ib aph(6)-Id</i>                           |
| Kp21 | pNDM-5_Kp21_1    | IncR / IncN               | 54.1   | 47.977     | 8                       | <i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> <i>sul1</i> <i>aadA2</i> <i>dfrA12</i> <i>mph(A)</i> <i>erm(B)</i> <i>rmtB</i>                              |
|      | pNDM-5_Kp21_2    | IncFIB(K)/IncFII          | 52.7   | 237.717    | 10                      | <i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> <i>sul1</i> <i>aadA2</i> <i>dfrA12</i> <i>mph(A)</i> <i>aph(3'')-Ib aph(6)-Id</i>                           |
| Kp23 | pNDM_Kp23_1      | IncR/ IncN                | 54.1   | 47.980     | 8                       | <i>bla</i> <sub>NDM-5</sub> <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> <i>sul1</i> <i>aadA2</i> <i>dfrA12</i> <i>mph(A)</i> <i>erm(B)</i> <i>rmtB</i>                              |
|      | pCTX-M-15_Kp23_1 | IncFIB(K)/IncFII          | 52.2   | 228.063    | 7                       | <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-172</sub> <i>sul2</i> <i>dfrA14</i> <i>aph(3'')-Ib aph(6)-Id</i>                   |
|      | pCTX-M-15_Kp23_2 | no detectado              | 47.0   | 122.692    | 5                       | <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> <i>sul2</i> <i>aph(3'')-Ib aph(6)-Id</i>                                                                 |
|      | pCTX-M-15_Kp23_3 | IncHI2/ IncHI2A/RepA      | 46.5   | 195.016    | 8                       | <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> <i>qnrB1</i> <i>dfrA14</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> <i>aph(3'')-Ib aph(6)-Id</i> |



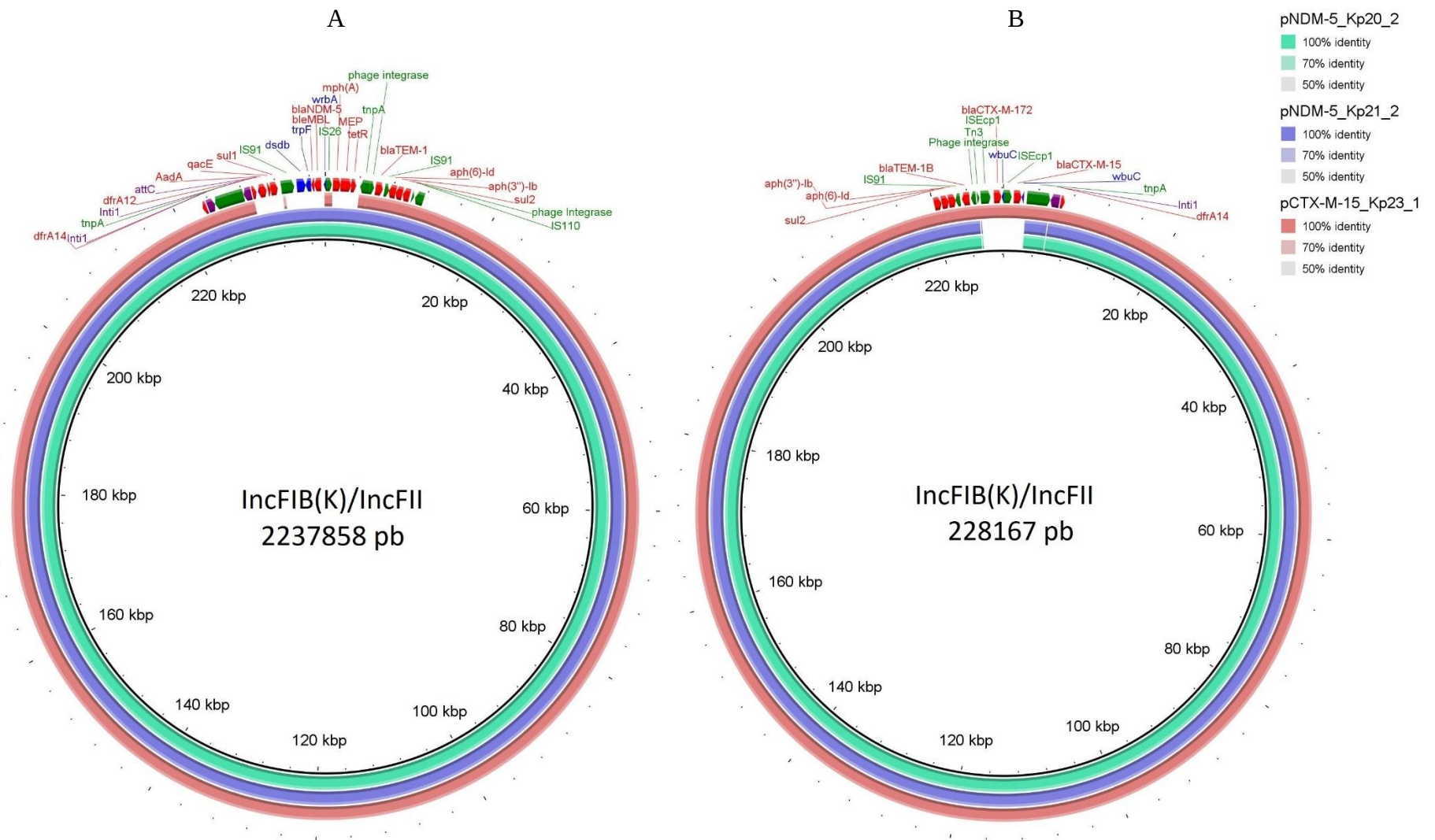
**Figura 8.** Representación gráfica y comparación de los plásmidos IncN/IncR de los aislamientos ST307. Se muestra en rojo genes de resistencia, en verde secuencias móviles, en violeta los componentes de integron y en azul otros genes.



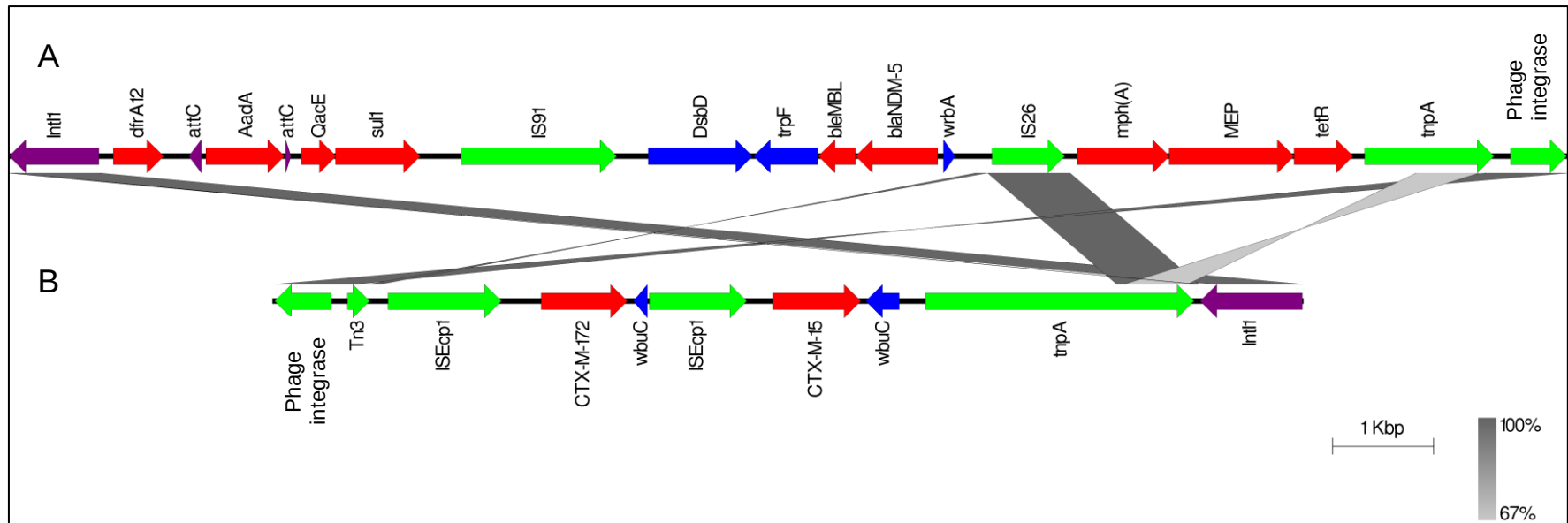
**Figura 9.** Alineamiento de los entornos genéticos de *bla*<sub>NDM-5</sub> del plásmido pNDM-5\_Kp20\_1 con plásmidos depositado en GenBank: CP095611, CP149828 y KT7257889; y el entorno genético de *bla*<sub>NDM-1</sub> del aislamiento Kpn10. Se muestra en verde secuencias de inserción, en rojo genes de resistencia antimicrobiana y en azul genes accesorios.

Los plásmidos IncFIB(K)/IncFII de estos aislamientos tienen aproximadamente 230 kb y también comprenden una región RMD de aproximadamente 20 kb, con alta carga de secuencias móviles y genes de resistencia (Figura 10A y 10B). En los aislamientos Kp20 y Kp21 los plásmidos son idénticos, con 100% de identidad y 100% de cobertura. La zona RMD codifica para varios genes de resistencia, dentro de los cuales se encuentra el gen que codifica para *bla*<sub>NDM-5</sub>. Sin embargo, en el aislamiento Kp23 se observa 95% de cobertura y 99% de identidad. Al comparar las secuencias plasmídicas de los tres aislamientos se puede observar una zona no homologa de aproximadamente 2000pb en la que se encuentran las regiones genéticas que codifican para la *bla*<sub>NDM-5</sub> en Kp20 y Kp21 y para *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en Kp23 (Figura 10A y 10B). Estos resultados sugieren el intercambio genético de una región por la otra. En los aislamientos Kp20 y Kp21 la región RMD tiene un integron de clase 1 que no está presente en el plásmido de Kp23. El entorno genético del gen NDM-5 en los plásmidos IncFIB(K)/IncFII, es prácticamente idéntico al que se encuentra en los plásmidos IncN/IncR de estos mismos aislamientos:  $\Delta$ ISA-*ba125/bla*<sub>NDM-5</sub>/*ble*<sub>MBL</sub>/*trpF/dsbD*. Dentro de la región RMD, están presentes también genes que confieren resistencia trimetoprima, sulfonamidas, macrólidos y aminoglucósidos

El plásmido IncFIB(K)/IncFII del aislamiento Kp23 contiene en su región RMD, el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> cuyo entorno genético es: *ISEcp1/bla*<sub>CTX-M-15</sub>/*wbuC/tnpA*. Adicionalmente también contiene el gen *bla*<sub>CTX-M-172</sub> que también es una BLEE, cuyo entorno genético es similar al de *bla*<sub>CTX-M-15</sub>: *ISEcp1/bla*<sub>CTX-M-172</sub>/*wbuC*. La localización de ésta estructura genética coincide con la región no homologa de los plásmidos en Kp20 y Kp21. En la figura 11 se muestra la comparación de la región no homologa de los plásmidos IncFIB(K)/IncFII.



**Figura 10.** Representación gráfica de los plásmidos IncFIB(K)/IncFII de los aislamientos Kp20, Kp21 y Kp23. A) Tomando como referencia el plásmido de Kp20. B) Tomando como referencia el plásmido de Kp23. Se muestra en rojo genes de resistencia, en verde secuencias móviles, en violeta los componentes del integron y en azul otros genes.

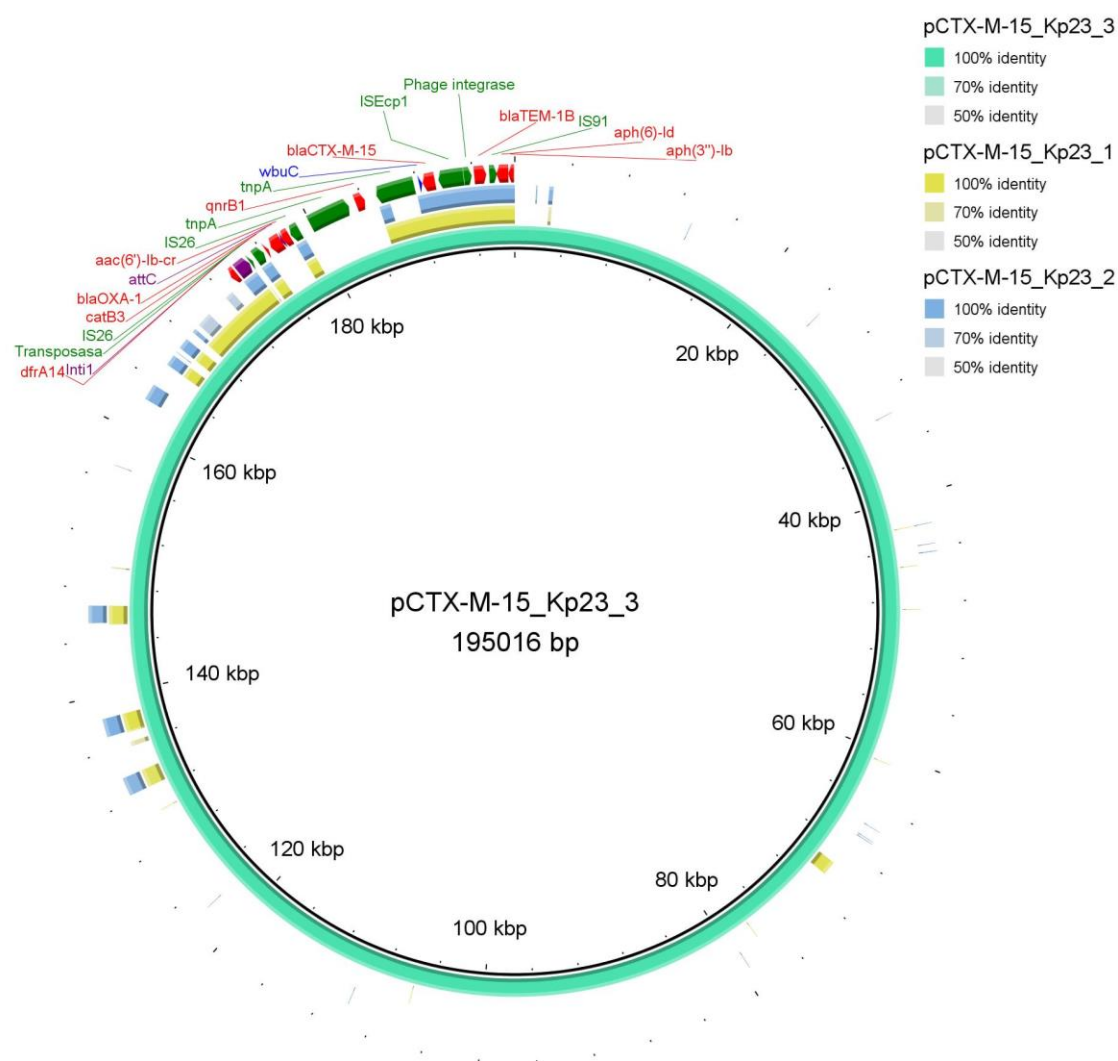


**Figura 11.** Representación gráfica de la región no homologa de los plásmidos IncFIB(K)/IncFII y su anotación. A) región no homologa plásmido IncFIB/IncFII de los aislamientos K20 y Kp21. B) región no homologa del plásmido IncFIB/IncFII del aislamiento Kp23.

El aislamiento Kp23 presenta 3 plásmidos que tienen el gen que codifica para la  $\beta$ -lactamasa CTX-M-15 (Tabla 20). La figura 12 muestra la representación gráfica de la comparación de los 3 plásmidos tomando como referencia el plásmido pCTX-M-15\_Kp23\_3. Como se puede observar, los plásmidos comparten una única región homologa donde se aloja el gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> con un entorno genético similar: *tnpA/wbuC/bla*<sub>CTX-M-15</sub>/*ISEcp1* (Figura 12).

El plásmido pCTX-M-15\_Kp23\_3 contiene una región RMD de aproximadamente 20Kb en la que, además de la BLEE, se encuentran genes de resistencia a antibióticos de interés clínico como ser *qnrB* y *acc(6')-Ib-cr*, que confieren resistencia a quinolonas. Adicionalmente se puede ver la presencia de un integron de clase 1 que porta los genes de resistencia *catB3*, *bla*<sub>OXA-1</sub> y *acc(6')-Ib-cr*.

El análisis BLAST de todo el plásmido pCTX-M-15\_Kp23\_3 mostró un 99,96% de identidad (94% de cobertura) con el plásmido P1 de *Enterobacter cloacae* 114, (Número de acceso: OW968297.1), que también posee el mismo perfil de múltiples replicones (IncHI2/IncHI2A/RepA). Adicionalmente, el análisis BLAST de la región RMD (~20 kb) mostró un 99,99% de identidad y 99% de cobertura con la región correspondiente de un plásmido de *Kp*, pKP\_160-2 (Número de acceso: CP078034.1), el cual pertenece a un tipo de plásmido de múltiples replicones diferente (IncFIB/IncR/IncHI1B).



**Figura 12.** Representación gráfica de los plásmidos del aislamiento Kp23 que contienen el gen de *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. El genoma de referencia es el plásmido pCTX-M-15\_Kp23\_3.

#### 4.3 Discusión plataformas genéticas plasmídicas de resistencia

Los plásmidos encontrados en los aislamientos en estudio presentaron los orígenes de replicación que comúnmente se reportan en cepas de *Kp* (Tablas 19 y 20) (Carattoli, 2009). Los plásmidos de mayor tamaño (>100Kb) presentaron un contenido G+C menor en comparación a los plásmidos más pequeños, lo que reduce el costo adaptativo asociado a su adquisición y favorece su mantenimiento en la bacteria (Yano et al., 2019).

Los plásmidos codificantes de *bla*<sub>NDM-5</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub> fueron todos plásmidos que pertenecían a 2 o 3 grupos de incompatibilidad plasmídica (Tablas 19 y 20), con regiones de aproximadamente 20Kb concentradas en genes de resistencia a antibióticos y elementos genéticos móviles. La

presencia de estos genes de resistencia en elementos genéticos móviles incrementa significativamente el riesgo de transferencia de resistencia entre distintos géneros bacterianos, incluyendo aquellos establecidos en entornos hospitalarios.

En los años recientes, varios estudios han mostrado la prevalencia de los plásmidos con grupo de incompatibilidad IncF subtipo IncFIB/IncFII asociados a múltiples genes de resistencia en *Kp*, similar a lo que revelan los aislamientos en estudio (Tabla 19 y 20) (Bougnom et al., 2020) (Wu et al., 2019).

Los plásmidos IncFIB(K)/IncFII y IncR/IncN presentes en Kp20 y Kp21 contienen ambos una región RMD con el mismo entorno genético de *bla*<sub>NDM-5</sub>, y varios genes de resistencia a las mismas clases de antibióticos (Figuras 8 y 10). Sin embargo, las regiones RMD no son idénticas, ya que contienen distintos genes de resistencia, presentan diferentes secuencias de inserción y difieren en su estructura. En este estudio el gen *bla*<sub>NDM-5</sub> fue encontrado formando parte de plásmidos, como suele encontrarse típicamente, sin embargo, se han reportado casos donde está formando parte del cromosoma de *Kp*, probablemente mediante recombinación sitio específica (Sakamoto et al., 2018) (S. Sahoo et al., 2023). La capacidad de *bla*<sub>NDM-5</sub> para diseminarse eficientemente entre plásmidos con diferentes grupos de incompatibilidad representa una preocupación significativa, como ha sido señalado en diversos estudios (Bonnin et al., 2012) (Zhu et al., 2024). Esta versatilidad en su diseminación ha favorecido la adaptación de los genes *bla*<sub>NDM</sub> a una amplia variedad de plásmidos y géneros bacterianos, lo que ha contribuido a su creciente prevalencia a nivel global. En consecuencia, su propagación se asocia estrechamente con la expansión de clones de alto riesgo, constituyendo un desafío crítico para el control de infecciones en entornos hospitalarios (S. Sahoo et al., 2023).

En dos de los aislamientos de *Kp* analizados (54-2 y Kp23), se identificaron plásmidos portadores del gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, una  $\beta$ -lactamasa tipo BLEE distribuida ampliamente a nivel global. La presencia de este determinante está comúnmente asociado a plásmidos con grupos de incompatibilidad IncF e IncHI2 en *Kp*, similar a los que se encuentra en los aislamientos estudiados y ha sido vinculada con la diseminación exitosa de cepas multirresistentes en entornos hospitalarios (Bevan et al., 2017).

Esta aceptado que algunos plásmidos tienen múltiples orígenes de replicación, ya que distintos orígenes pueden ser funcionales en diferentes tipos de hospedadores (Bukhari et al., 1977). La detección de plásmidos con esta característica en la clona ST307 sugiere la posibilidad de su

transferencia entre distintos hospedadores, estrategia que podría estar siendo utilizada para ampliar su diseminación. En particular, un plásmido multirreplicón idéntico al plásmido pQnrB\_Kp23 que contiene tres replicones (IncHI2/IncHI2A/RepA) y que albergaba un preocupante locus MDR altamente recombinogénico, fue detectado en un aislamiento clínico de *Enterobacter cloacae* (número de acceso: OW968297.1), lo que sugiere movilidad plasmídica entre diferentes especies. Esto que resalta la importancia de estos elementos genéticos en la propagación de la resistencia a los antibióticos.

Dado que la mayoría de los genes de resistencia a los antimicrobianos se encuentran localizados en plásmidos y se transmiten a otros microorganismos mediante transferencia horizontal de genes, la secuenciación de plásmidos con lecturas largas resulta esencial para caracterizar los mecanismos de resistencia, comprender las bases de la diseminación plasmídica y realizar el seguimiento de patógenos multirresistentes en estudios de vigilancia epidemiológica tanto en entornos hospitalarios como comunitarios (Valcek et al., 2022) (Hadjadj et al., 2022).

## 5. Evaluación de la CIM de los compuestos en estudio

Se evaluó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de cada compuesto frente a los aislamientos 54-1 y 54-2, con el objetivo de determinar las concentraciones a utilizar en los ensayos de inhibición y/o erradicación de biopelícula. Los resultados se presentan en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Resultados de la CIM de los compuestos a evaluar su potencia antibiofilm

|                                      | CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) |      |
|--------------------------------------|--------------------------|------|
|                                      | 54-1                     | 54-2 |
| Colistina                            | 1                        | 1    |
| Cu-sulfametoxazol (1) marrón verdoso | 640                      | 512  |
| Cu-sulfametoxazol (2) marrón         | 640                      | 512  |
| Cu-sulfadiazina                      | 320                      | 256  |
| Cu-sulfacloropiridazina              | 640                      | 512  |
| Cu-sulfametazina                     | 640                      | 512  |
| Cu-sulfametizole                     | 160                      | 128  |
| Ag-sulfacloropiridazina              | 16                       | 16   |
| Ag-sulfamoxol                        | 16                       | 16   |
| Ag-SCN-SCP                           | 16                       | 16   |
| Zn-Xylitol                           | 32                       | 32   |
| Cu-Xylitol                           | 32                       | 32   |
| Cu-Manitol                           | 32                       | 32   |
| Cu-Eritritol                         | 32                       | 32   |
| Cu-Sorbitol                          | 32                       | 32   |
| Co-Sorbitol                          | 32                       | 32   |
| Ni-Sorbitol                          | 32                       | 32   |

Como se observa en la Tabla 21, los valores de CIM son idénticos para los compuestos de sulfonamidas de plata y los polioles metálicos. Los compuestos polioles presentan una CIM de 32  $\mu\text{g/mL}$  para ambos aislamientos. Por otro lado, los complejos de cobre con sulfonamidas muestran valores de CIM significativamente más altos (160-640  $\mu\text{g/mL}$ ) en comparación con los complejos de plata, cuyos valores de CIM son notablemente más bajos (16  $\mu\text{g/mL}$ ).

## 6. Evaluación de la producción de biofilm de los aislamientos estudiados

### 6.1 Determinación de las condiciones óptimas de producción de biofilm

Los resultados de  $DO_{590}$  de los experimentos realizados con distintos medios de cultivo y a distinto tiempo de incubación se organizaron en una hoja de cálculo. Se sustrajo el control del blanco y se analizaron teniendo en cuenta que el coeficiente de variación (%CV) no superara el 30%. Los resultados de dos replicas independientes se muestran en la Tabla 22.

**Tabla 22.** Valores de Absorbancia a 590nm de formación de biofilm en diferentes condiciones.

| 24hs  | 54-1  |       |       |       |       |       | 54-2  |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|       | TSB   | TBS/G | LBB   | LBB/G | M9    | M9/G  | TSB   | TBS/G | LBB   | LBB/G | M9    | M9/G  |
| Exp 1 | 0,289 | 0,332 | 0,475 | 0,291 | 1,355 | 0,924 | 0,301 | 0,708 | 0,380 | 0,306 | 1,193 | 0,735 |
|       | 0,230 | 0,322 | 0,555 | 0,304 | 1,522 | 0,819 | 0,412 | 0,691 | 0,403 | 0,346 | 1,245 | 0,795 |
|       | 0,369 | 0,376 | 0,312 | 0,284 | 1,548 | 0,847 | 0,498 | 0,492 | 0,418 | 0,272 | 1,153 | 0,819 |
| Exp 2 | 0,429 | 0,372 | 0,378 | 0,265 | 1,534 | 0,957 | 0,414 | 0,440 | 0,405 | 0,265 | 1,131 | 0,779 |
|       | 0,444 | 0,447 | 0,453 | 0,280 | 1,386 | 0,81  | 0,350 | 0,466 | 0,472 | 0,233 | 1,102 | 0,885 |
|       | 0,473 | 0,454 | 0,424 | 0,282 | 1,378 | 0,814 | 0,430 | 0,520 | 0,364 | 0,294 | 1,255 | 0,812 |

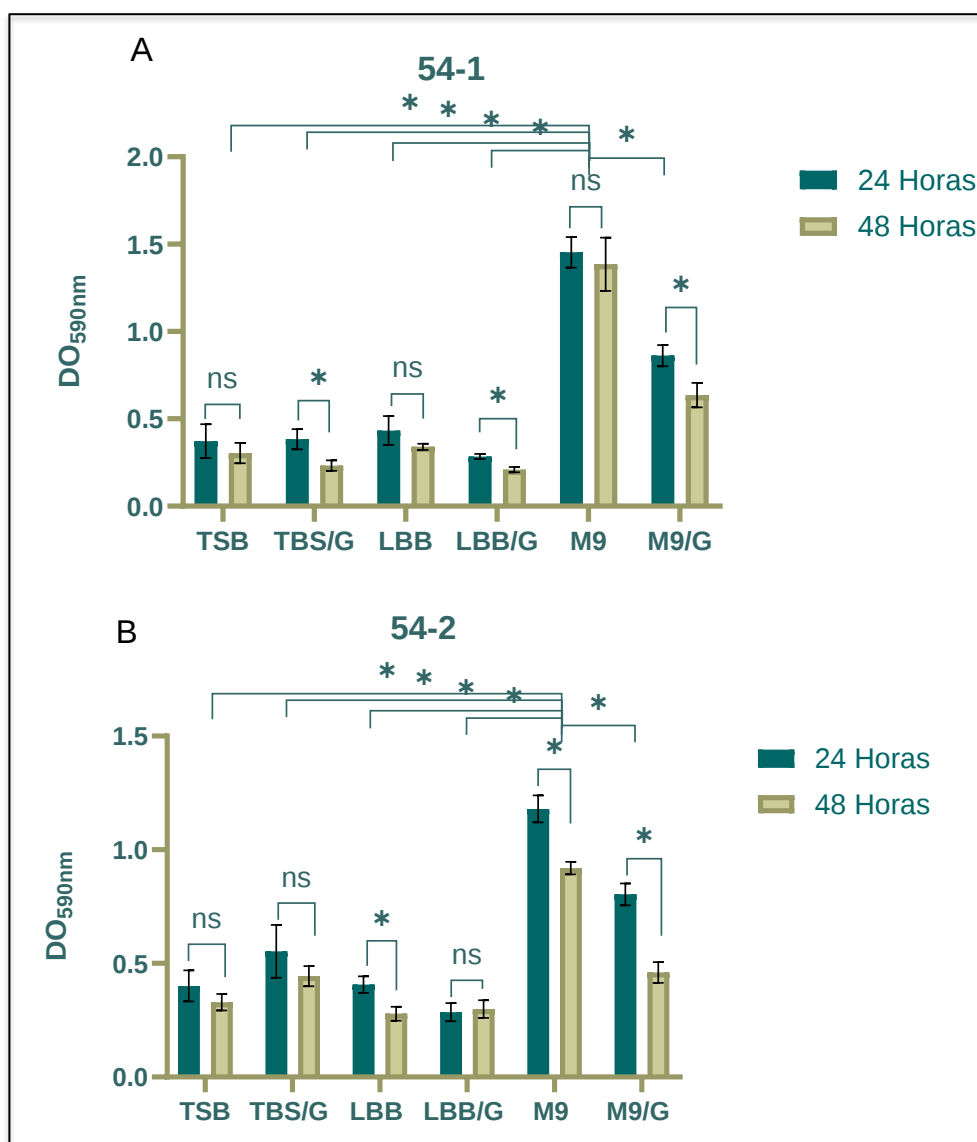
  

| 48hs  | 54-1  |       |       |       |       |       | 54-2  |       |       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|       | TSB   | TBS/G | LBB   | LBB/G | M9    | M9/G  | TSB   | TBS/G | LBB   | LBB/G | M9    | M9/G  |
| Exp 1 | 0,307 | 0,194 | 0,343 | 0,224 | 1,202 | 0,588 | 0,349 | 0,437 | 0,295 | 0,281 | 0,922 | 0,535 |
|       | 0,223 | 0,245 | 0,349 | 0,210 | 1,375 | 0,545 | 0,373 | 0,467 | 0,268 | 0,301 | 0,914 | 0,430 |
|       | 0,377 | 0,199 | 0,316 | 0,207 | 1,524 | 0,655 | 0,354 | 0,458 | 0,227 | 0,324 | 0,952 | 0,484 |
| Exp 2 | 0,306 | 0,254 | 0,335 | 0,180 | 1,352 | 0,748 | 0,302 | 0,483 | 0,274 | 0,354 | 0,890 | 0,449 |
|       | 0,350 | 0,231 | 0,335 | 0,220 | 1,595 | 0,655 | 0,313 | 0,362 | 0,292 | 0,292 | 0,887 | 0,410 |
|       | 0,260 | 0,273 | 0,363 | 0,211 | 1,260 | 0,627 | 0,283 | 0,457 | 0,317 | 0,239 | 0,946 | 0,454 |

Para evaluar las diferencias entre los medios de cultivo a las 24 y 48 horas se utilizó el test t múltiple. La diferencia significativa se determinó usando el método de Holm-Sidak con alfa  $<0.05$ . En la Figura 13 se presentan los resultados de la formación de biofilm bajo las distintas condiciones evaluadas para los aislamientos 54-1 y 54-2. Como se observa en la gráfica, el medio de cultivo M9 sin suplemento de glucosa mostró la mayor capacidad de formación de biofilm en ambos aislamientos. Además, el tiempo de incubación de 24 horas fue el que generó los mejores resultados. En el aislamiento 54-2, la cantidad de biofilm cuantificada disminuyó

significativamente a las 48 horas, mientras que en el aislamiento 54-1 no se observaron diferencias significativas entre los tiempos de incubación.

En conclusión, las condiciones óptimas para la formación de biofilm en estos aislamientos de *kp* fueron el uso del medio M9 sin suplemento de glucosa y un tiempo de incubación de 24 horas. Estas condiciones se utilizaron en los ensayos posteriores de producción, inhibición y erradicación de biofilm.

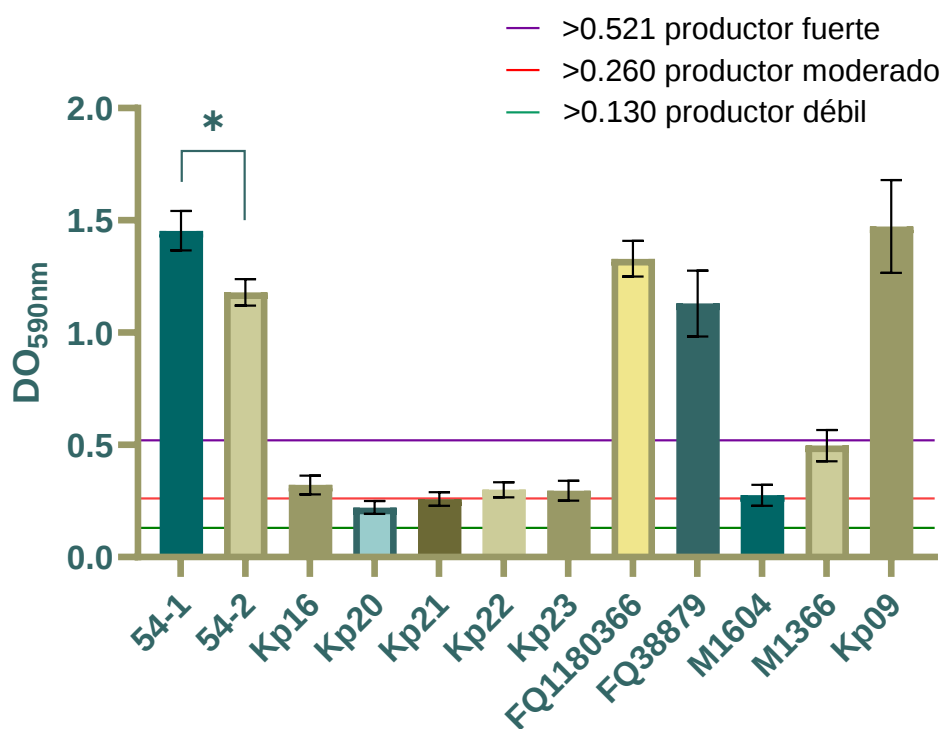


**Figura 13.** Formación de biofilm en distintas condiciones de medio de cultivo y tiempo de incubación del aislamiento 54-1 en A y 54-2 en B.

Aclaraciones: TSB: caldo de Soya Triptic; TBS/G: caldo de Soya Triptic suplementado con glucosa 20%; LBB: caldo Luria-Bertani; LBB/G: caldo Luria-Bertani suplementado con glucosa 20%; M9: medio mínimo M9; M9/G: medio mínimo M9 suplementado con glucosa 20%; ns: no diferencia significativa; \*: diferencia significativa  $p < 0.05$ .

## 6.2 Evaluación de la producción de biofilm

Se evaluó la capacidad de producción de biofilm de los aislamientos en estudio, y se observó que todos fueron capaces de formar biofilm (Figura 14, Tabla 23). El aislamiento 54-1 mostró una capacidad significativamente mayor de formación de biofilm en comparación con el aislamiento 54-2, y ambos fueron clasificados como fuertes productores de biofilm. Dentro de los aislamientos resistentes a colistina, FQ1180366, FQ38879 y Kp09 se clasificaron como fuertes productores, mientras que Kp16, Kp20, Kp21, Kp22, Kp23, M1366 y M1604 se catalogaron como productores moderados.



**Figura 14.** Formación de biofilm de los aislamientos 54-1, 54-2 y los aislamientos resistentes a colistina. Aclaraciones: La línea verde, roja y violeta marcan los límites para la clasificación de los microorganismos en no formador, leve, moderado y fuerte formador de biofilm respectivamente. DO<sub>590nm</sub>: densidad óptica a 590nm. \*: diferencia significativa  $p < 0.05$ .

**Tabla 23.** Valores estadísticos de formación de biofilm.

|                  | 54-1  | 54-2  | FQ1180366 | FQ38879 | M1366 | M1604 | Kp09  | Kp16  | Kp20  | Kp21  | Kp22  | Kp23  |
|------------------|-------|-------|-----------|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Prom             | 1,454 | 1,18  | 1,329     | 1,130   | 0,497 | 0,276 | 1,473 | 0,322 | 0,221 | 0,259 | 0,300 | 0,296 |
| DS               | 0,09  | 0,062 | 0,082     | 0,149   | 0,068 | 0,047 | 0,202 | 0,04  | 0,029 | 0,03  | 0,034 | 0,046 |
| %CV              | 6     | 5     | 6         | 13      | 14    | 17    | 14    | 13    | 13    | 12    | 11    | 15    |
| N°               | 6     | 6     | 6         | 6       | 5     | 6     | 6     | 7     | 6     | 5     | 7     | 7     |
| DO <sub>CN</sub> | 0,085 |       |           |         |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 3XDS             | 0,015 |       |           |         |       |       |       |       |       |       |       |       |
| DOc              | 0,130 |       |           |         |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 2XDOc            | 0,260 |       |           |         |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 4XDOc            | 0,521 |       |           |         |       |       |       |       |       |       |       |       |

Aclaraciones. DS: desviación estándar, %CV: coeficiente de variación, N°: número de replicas, DO<sub>CN</sub>: densidad óptica del control negativo, DS<sub>CN</sub>: desviación estándar del control negativo, Doc: densidad óptica control.

### 6.3 Discusión formación de biofilm

En los ensayos de evaluación de las mejores condiciones para formar el biofilm, el medio M9 sin suplemento de glucosa fue el que mostró la mayor capacidad de formación de biofilm en los aislamientos 54-1 y 54-2. Estos resultados coinciden con lo reportado en estudios que emplean medios mínimos como M9 para evaluar la formación de biofilm en *Kp* y otros bacilos Gram negativos, donde la limitación nutricional parece estimular un biofilm más estable y homogéneo respecto a caldos ricos como LBB o TSB (Moreno et al., 2015) (Naves et al., 2008).

El medio M9 sin glucosa mostró un mayor rendimiento en la formación de biofilm en comparación con el mismo medio suplementado con glucosa. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Horng et al. (Horng et al., 2023), quienes observaron que, en determinadas cepas de *Kp*, la adición de glucosa reprime la expresión de la fimbria tipo 3 (MrkA), reduciendo así la capacidad de adhesión y, en consecuencia, la formación de biofilm. No obstante, otros estudios han descrito resultados opuestos. Ignatova et al. (Ignatova et al., 2023), reportaron que la presencia de glucosa incrementa la producción de matriz extracelular en *Kp*, favoreciendo la formación de biofilm.

Respecto al tiempo de incubación, la mayor formación de biofilm se observó a las 24 horas, disminuyendo a las 48 horas. Aunque en la literatura se ha descrito que la biomasa puede incrementarse hasta las 48–72 horas en *Kp* y otros patógenos (Vazquez et al., 2022), muchos autores describen que hay cepas de *Kp* que son capaces de madurar el biofilm en tiempos menores dando lugar a la reestructuración y desprendimiento celular por agotamiento de nutrientes, reduciendo la biomasa adherida a tiempos tardíos (Horng et al., 2023) (Oleksy-Wawrzyniak et al.,

2021). Los resultados de esta tesis sugieren que los aislamientos estudiados producen biopelículas rápidamente, alcanzando un máximo en 24 horas y entrando luego en una fase de dispersión.

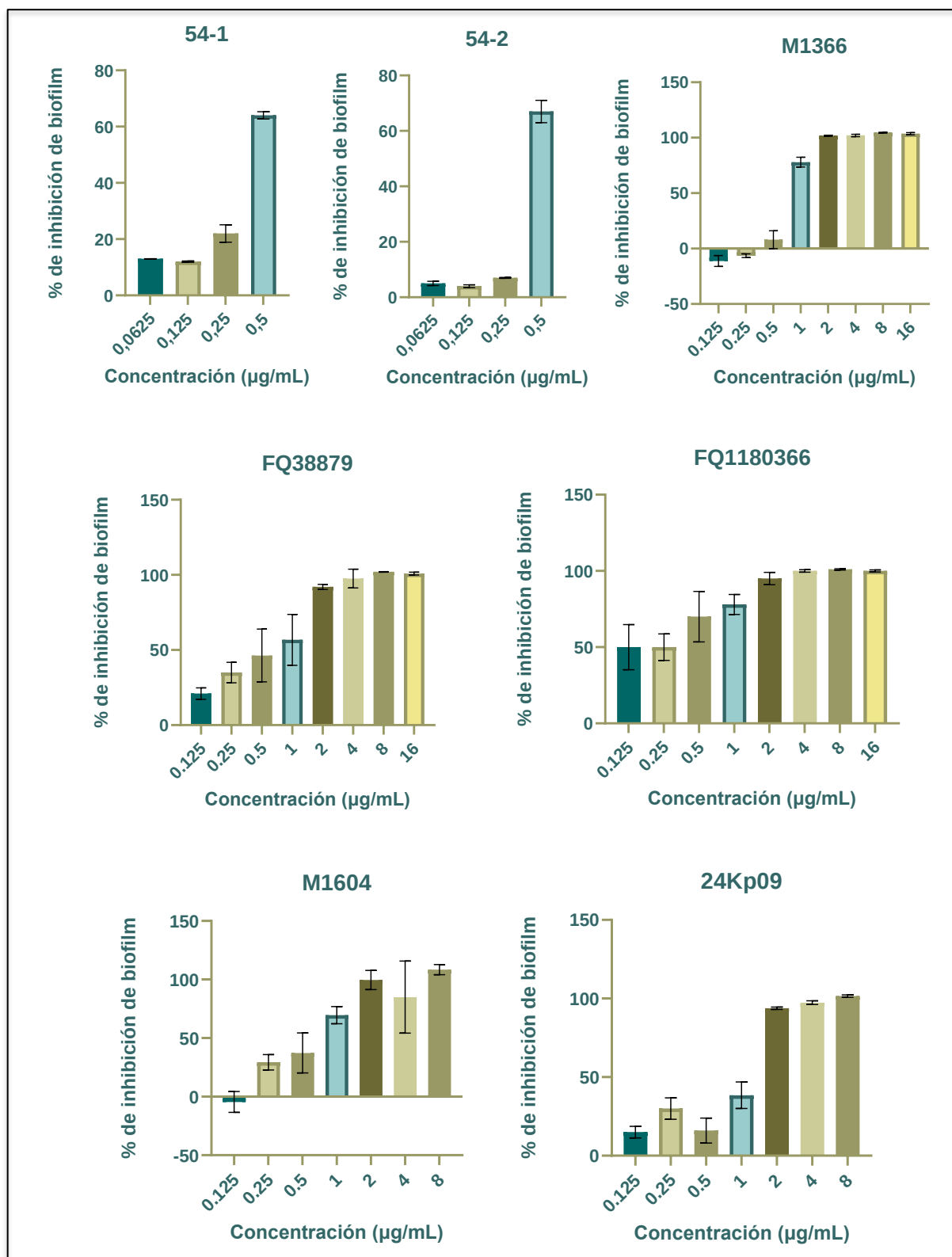
Los aislamientos en estudio mostraron variabilidad en la capacidad de formación de biofilm, con algunos clasificados como fuertes productores, otros como moderados y otros como débiles. Esto concuerda con lo reportado por otros autores, donde si bien *Kp* es reconocida como una especie con capacidad de formar biofilm, no todos los aislados clínicos presentan el mismo potencial (Sabença et al., 2023) (Nirwati et al., 2019). La variabilidad observada en la capacidad de formación de biofilm entre cepas ha sido atribuida, en parte, a factores genéticos, como la presencia de adhesinas específicas y la regulación diferencial de la expresión de fimbrias (Fleeman et al., 2024).

## 7. Evaluación de la capacidad antibiofilm de compuestos metálicos y colistina

### 7.1 Inhibición de biofilm por colistina

Para representar los resultados, se graficó el porcentaje de inhibición de biofilm en función de la concentración de colistin evaluada para cada aislamiento (Figura 15).

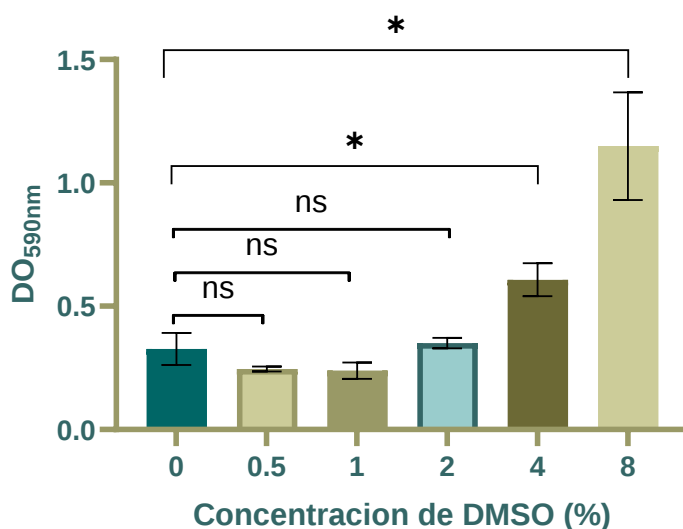
Como se desprende de la figura 15 la colistina mostro capacidad de inhibir hasta un 60% del biofilm en su concentración próxima a la CIM notando un descenso es esta capacidad a 20% o menos en las concentraciones más bajas. Este resultado probablemente indique que la capacidad de inhibir el biofilm a 0.5 µg/ml tenga que ver con la inhibición de crecimiento bacteriano ya que es la concentración próxima a la CIM. En los aislamientos resistentes a colistina se observa que la inhibición del biofilm aumenta con la concentración alcanzando un valor cercano al 100% de inhibición a concentraciones de 2 µg/ml en adelante.



**Figura 15.** inhibición de biofilm por acción de distintas concentraciones de colistina en distintos aislamientos.

## 7.2 Inhibición de biofilm por complejos metálicos

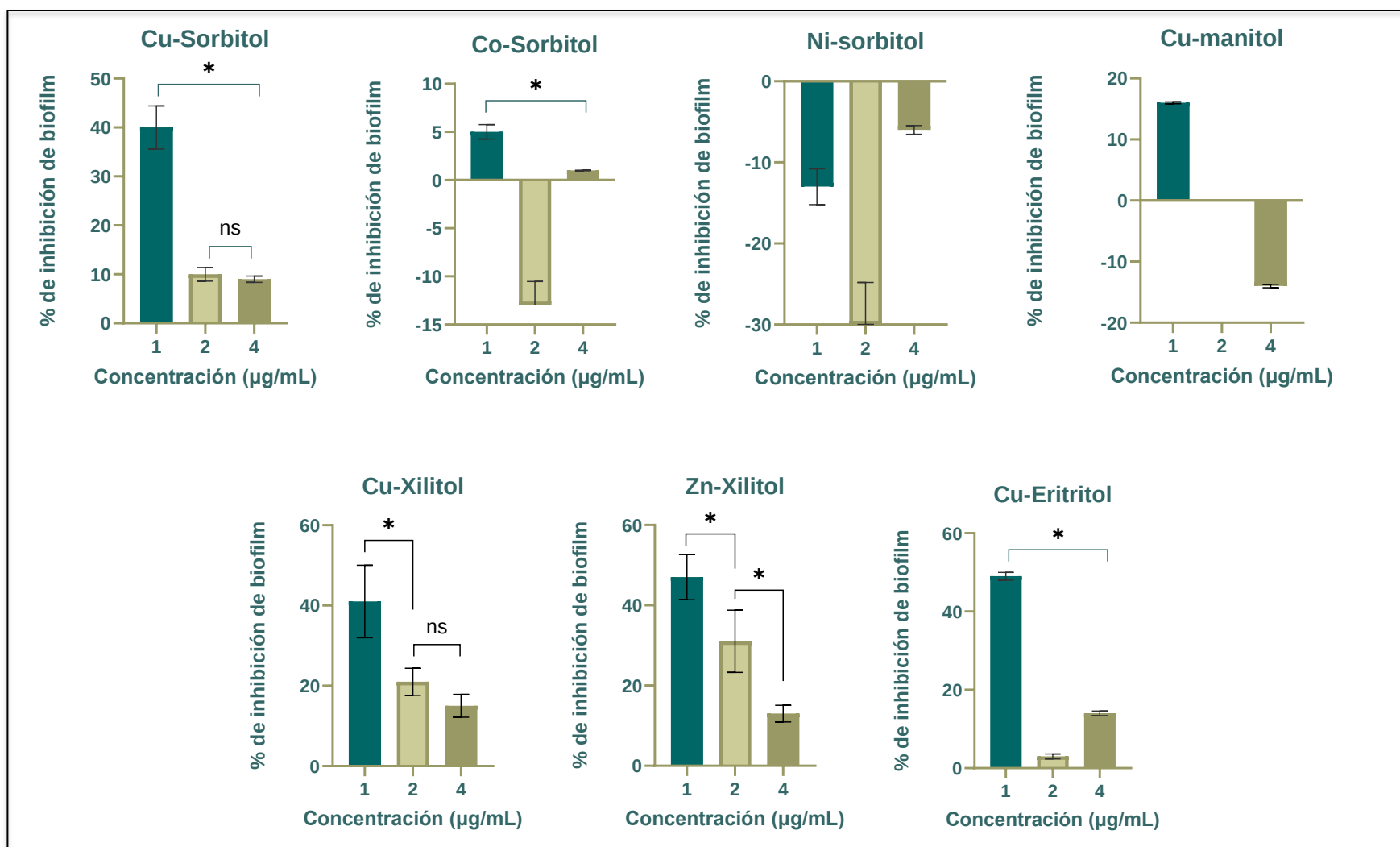
Teniendo en cuenta que el DMSO puede influir en la formación de biofilm, se consideraron únicamente aquellas concentraciones de los compuestos en las que la misma concentración de DMSO no alterara significativamente dicha formación. Para verificar esto, se incluyeron controles en los que se evaluaron las concentraciones de DMSO presentes en las diluciones de los compuestos.



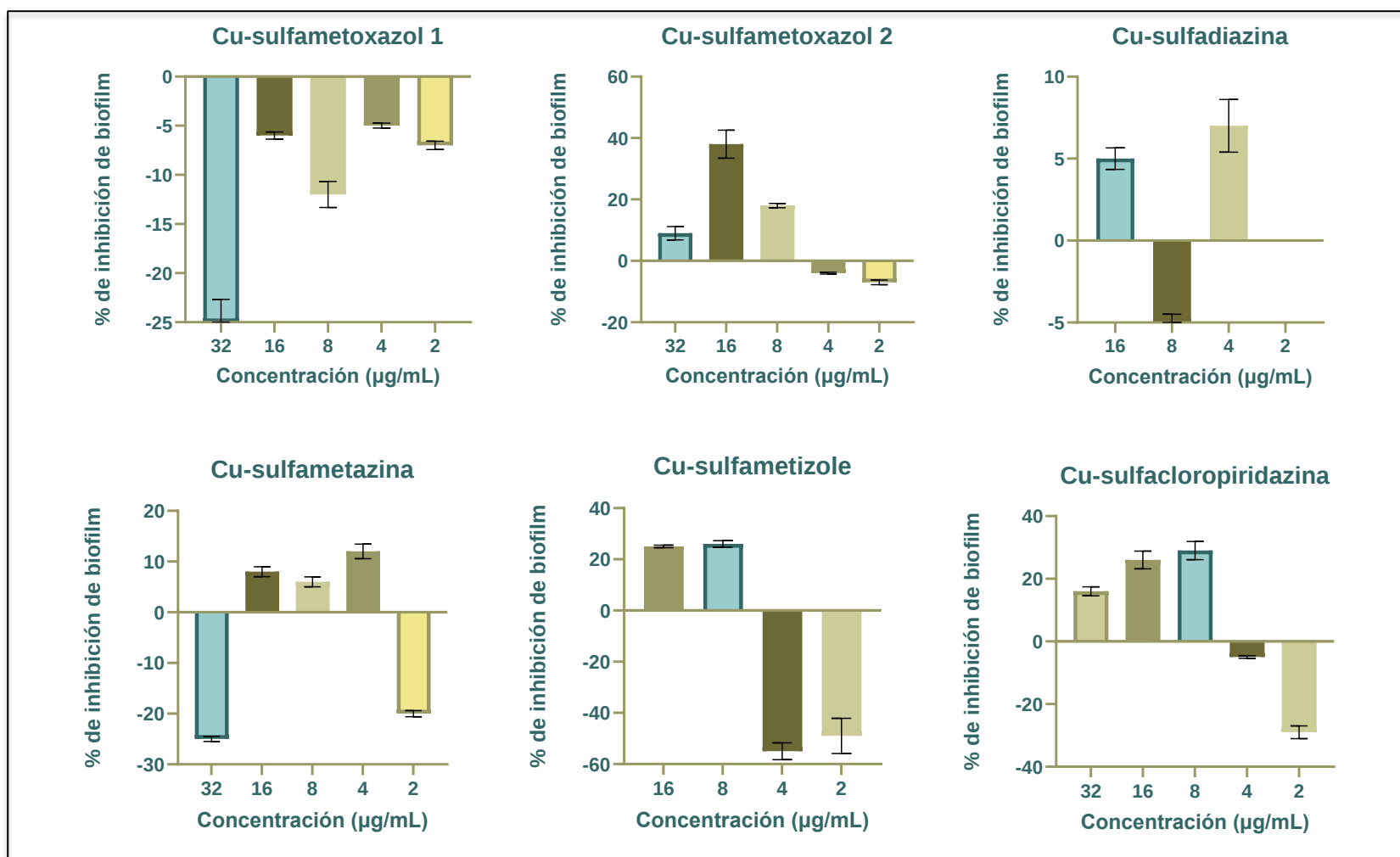
**Figura 16.** Efecto del DMSO en la producción de biofilm del aislamiento 54-1 a distintas concentraciones. Aclaraciones: ns: no diferencia significativa; \*diferencia significativa  $p < 0.05$ .

En la Figura 16 se presentan los resultados de formación de biofilm a distintas concentraciones de DMSO. Como se observa, el DMSO indujo una sobreproducción de biofilm a concentraciones del 4% y 8%, mientras que no afectó la formación de biofilm en el resto de las concentraciones evaluadas. Con base en estos resultados, se analizaron únicamente los efectos de los compuestos sobre el biofilm cuando la concentración final de DMSO fue inferior al 4%.

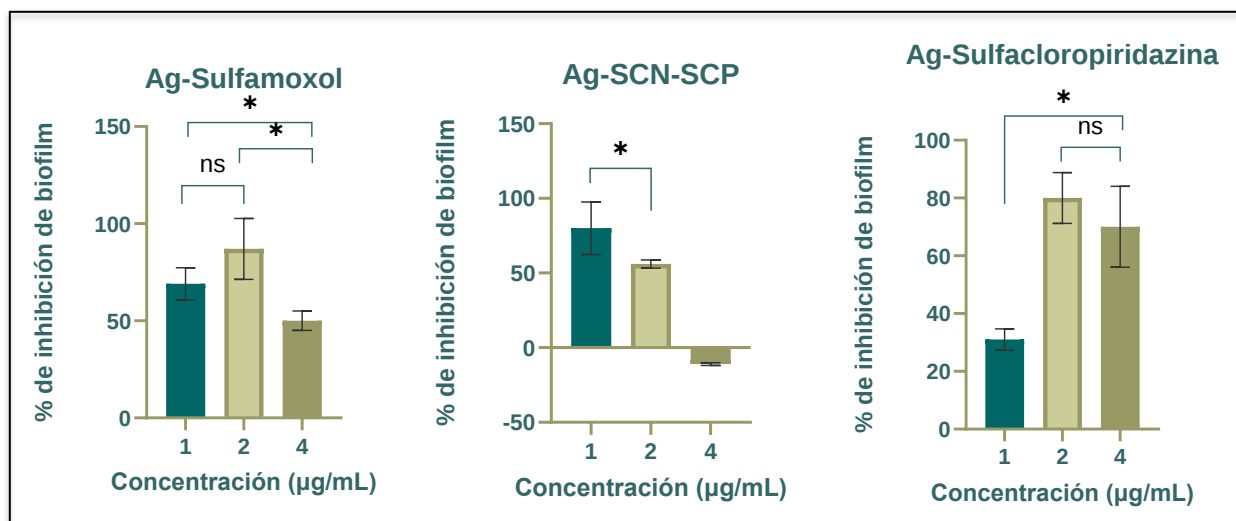
Los resultados de inhibición de biofilm de los complejos polioles y las sulfonamidas de plata y cobre se muestran en las figuras 17, 18 y 19, respectivamente. Los resultados obtenidos indican que los complejos de Ag con sulfonamidas presentan una mayor capacidad de inhibición de formación de biofilm en comparación con los complejos de Cu con sulfonamidas y los polioles metálicos.



**Figura 17.** Porcentaje de inhibición de biofilm del aislamiento 54-1 en presencia de distintos complejos polioles metálico a concentraciones sub-inhedoras. \*: diferencia significativa  $p < 0.05$ . ns: diferencia no significativa.



**Figura 18.** Porcentaje de inhibición de biofilm del aislamiento 54-1 en presencia de distintas sulfonamidas heterocíclicas de Cu a concentraciones sub-inhedoras.



**Figura 19.** Porcentaje de inhibición de biofilm del aislamiento 54-1 en presencia de distintas sulfonamidas de Ag a concentraciones sub-inhedoras. Aclaraciones: \*: diferencia significativa  $p < 0.05$ . ns: diferencia no significativa.

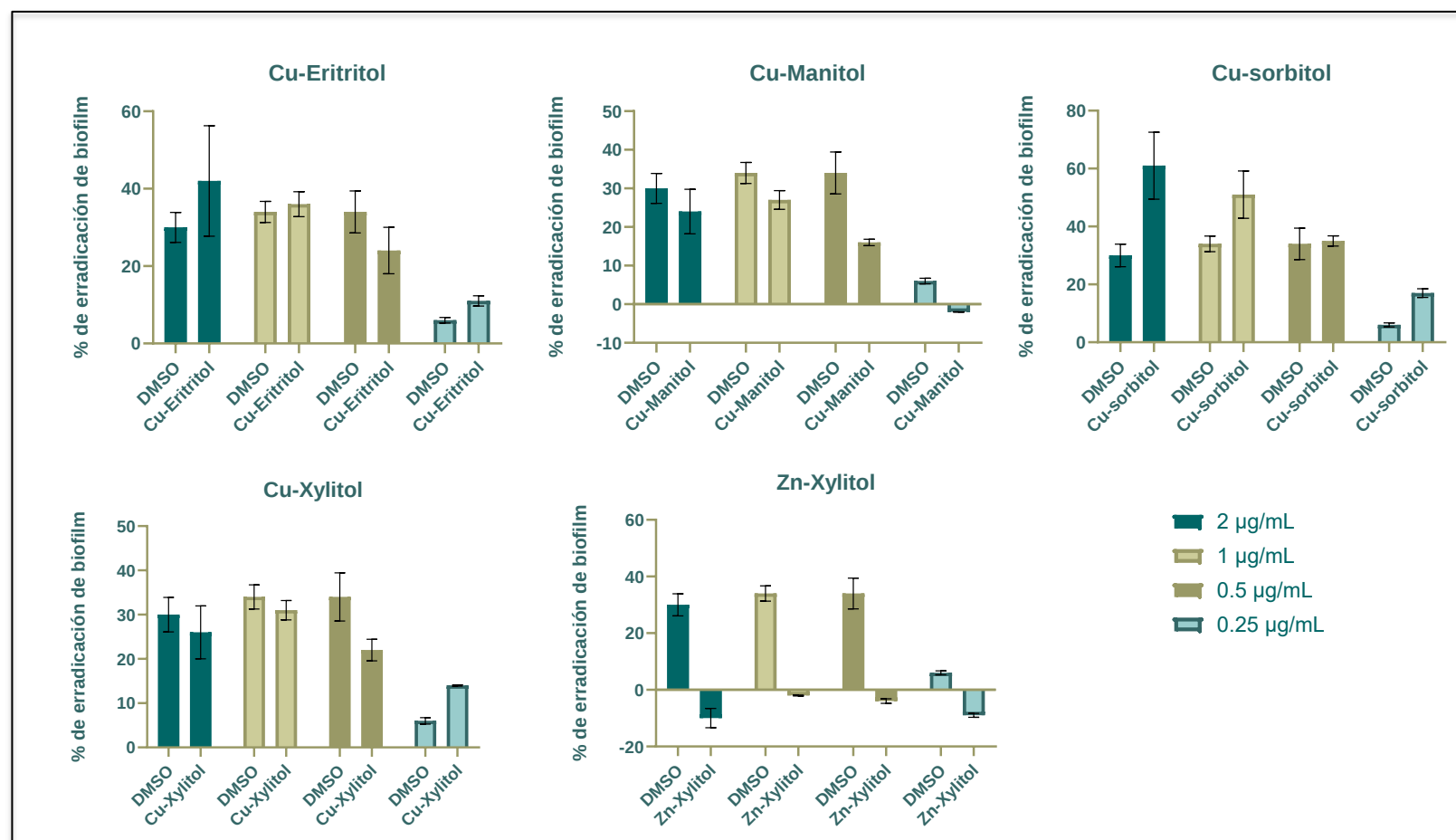
En el caso de los polioles metálicos, los resultados fueron variables: mientras que algunos compuestos exhibieron cierta capacidad inhibitoria, otros parecieron estimular la producción de biofilm (Figura 17). Entre los compuestos evaluados, Ni-sorbitol, Co-sorbitol y Cu-manitol no mostraron capacidad para inhibir el biofilm en las condiciones ensayadas. En contraste, Cu-sorbitol, Cu-eritritol, Zn-xilitol y Cu-xilitol lograron inhibir hasta un 40% la formación de biofilm a una concentración de 1 µg/mL.

Entre los complejos de sulfonamidas de Cu (Figura 18), es de notar que, siendo que ambos compuestos tienen el mismo ligando, Cu-sulfametoxazol 1 mostro un efecto de sobreproducción de biofilm en todas las concentraciones ensayadas, mientras que el Cu-sulfametoxazol 2 logró inhibir la formación de biofilm en las concentraciones más altas, aunque a muy bajo nivel. Los compuestos Cu-sulfadiazina, Cu-sulfametizole y Cu-sulfametazina mostraron un efecto de sobreproducción de biofilm o, en algunos casos, lograron inhibirlo en un máximo del 20%. Por otro lado, el Cu-sulfaclopiridazina alcanzó niveles de inhibición ligeramente mayores, aunque sin superar el 40%. Dado su bajo impacto en la inhibición de biofilm, los complejos de Cu-sulfonamidas no se consideran prometedores para este propósito.

Los compuestos sulfonamidas de Ag, lograron inhibir la formación de biofilm a bajas concentraciones en más del 50% (figura 19), siendo la Ag-sulfamoxol el que logro mejores resultados.

### 7.3 Erradicación de biofilm por complejos metálicos

Los ensayos de erradicación de biofilm se realizaron con los compuestos polioles metálicos y las sulfonamidas heterocíclicas de Cu y Ag. Para cada ensayo se incluyó un control con DMSO a la misma concentración presente en cada una de las condiciones evaluadas. Teniendo en cuenta que las infecciones causadas por agentes formadores de biofilm se tratan cuando el biofilm ya está formado, evaluar la erradicación de biofilm es un ensayo que muestra una aproximación de lo que podría suceder in vitro. Para considerar si un compuesto es prometedor para erradicar el biofilm tendremos en cuenta que el porcentaje de erradicación del biofilm sea de al menos el 50%. En la figura 20, 21 y 22, se muestran los resultados para los distintos compuestos en sus distintas concentraciones y sus respectivos controles con DMSO.

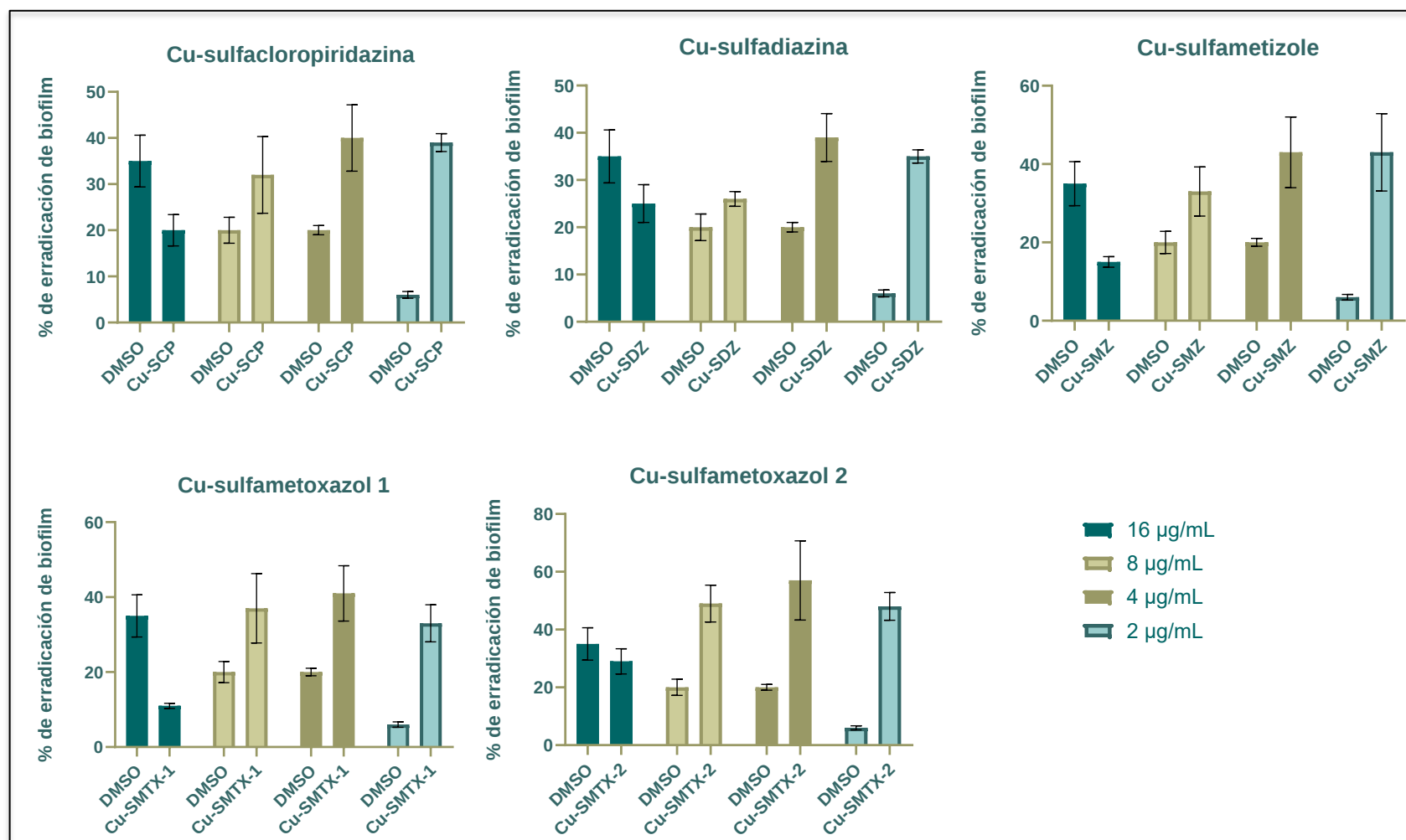


**Figura 20.** Porcentaje de erradicación de biofilm de los compuestos de polioles. DMSO: dimetilsulfóxido. Para cada concentración ensayada se muestra también el efecto del DMSO a la misma concentración.

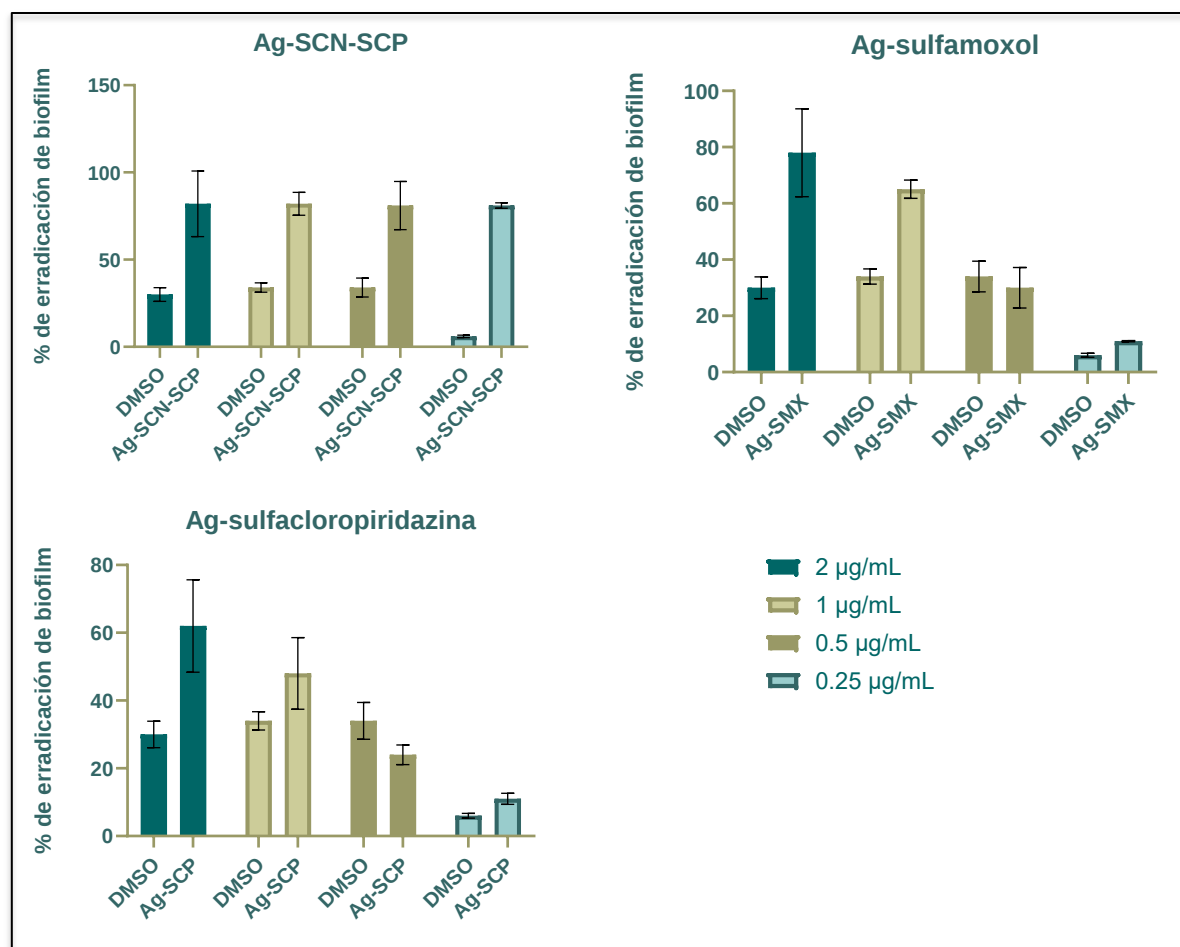
Entre los compuestos polioles metálicos evaluados, Cu-sorbitol fue el único que mostró una erradicación superior al 50%, específicamente a concentraciones de 2 y 1  $\mu\text{g/mL}$  (figura 20). El complejo Cu-xilitol tuvo un porcentaje de erradicación comparable al del control con DMSO en las concentraciones de 2, 1 y 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que a 0.25  $\mu\text{g/mL}$  logró una erradicación de hasta el 15%, un valor relativamente bajo. Un comportamiento similar se observó con Cu-eritritol. En contraste, el Zn-xilitol no mostró capacidad de erradicación en ninguna de las concentraciones ensayadas. Por su parte, Cu-manitol mostró el mismo nivel de erradicación que su control con DMSO en las concentraciones de 1 y 2  $\mu\text{g/mL}$ , siendo la concentración de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  en la que se alcanza una erradicación de alrededor del 30%.

Entre las sulfonamidas de Cu evaluadas (Figura 21), Cu-sulfametoxazol 2 fue el único compuesto que logró una erradicación de biofilm superior al 50% a concentraciones de 2, 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$ . El compuesto de Cu-sulfacloropiridazina mostró capacidad para erradicar hasta un 40% del biofilm en las concentraciones de 2, 4 y 8  $\mu\text{g/mL}$ , siendo en todos los casos superior a su control con DMSO. Un comportamiento similar se observó con Cu-sulfametoxazol 1. Por su parte, Cu-sulfametizole logró erradicar hasta un 40% del biofilm a concentraciones de 2 y 4  $\mu\text{g/mL}$ ; sin embargo, a concentraciones superiores, el porcentaje de erradicación fue menor y comparable al control con DMSO. Estos resultados sugieren que Cu-sulfametoxazol 2 es el compuesto más prometedor dentro de este grupo, seguido de Cu-sulfacloropiridazina y Cu-sulfametoxazol 1, que también mostraron una capacidad moderada de erradicación del biofilm.

Entre las sulfonamidas de plata (Figura 22), Ag-SCN-SCP mostró capacidad de erradicar hasta un 80% del biofilm formado en todas las concentraciones ensayadas. Ag-Sulfamoxol logró erradicar entre un 70% y 80% del biofilm a concentraciones de 1 y 2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, mientras que a concentraciones menores no mostró efecto. Por su parte, el complejo Ag-Sulfacloropiridazina presentó un comportamiento similar, aunque con una menor capacidad de erradicación, alcanzando aproximadamente un 60% a una concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$ . Estos resultados sugieren que el Ag-SCN-SCP y el Ag-Sulfamoxol son los compuestos más prometedores dentro de este grupo, con un alto porcentaje de erradicación del biofilm, mientras que el Ag-Sulfacloropiridazina mostró una menor eficacia.



**Figura 21.** Porcentaje de erradicación de biofilm de los compuestos de Cu con sulfonamidas heterocíclicas. DMSO: dimetilsulfóxido; SCP: sulfaclopiridazina, SDZ: sulfadiazina, SMX: sulfametizole, SMTX: sulfametoxazol. Para cada concentración ensayada se muestra también el efecto del DMSO a la misma concentración.



**Figura 22.** Porcentaje de erradicación de biofilm de los compuestos de Ag con sulfonamidas heterocíclicas. DMSO: dimetilsulfóxido: SCP: sulfaclopiridazina, SDZ: sulfadiazina, SMX: sulfametizole, SMTX: sulfametoxazol. Para cada concentración ensayada se muestra también el efecto del DMSO a la misma concentración.

#### 7.4 Discusión de los resultados de inhibición y erradicación de biofilm

Los compuestos más prometedores para la erradicación de biofilm fueron las sulfonamidas de Ag, en particular Ag-SCN-SCP y Ag-sulfamoxazol. La notable eficacia de estos compuestos podría atribuirse al metal al que están acomplejados, siendo la Ag un potente antimicrobiano y antibiofilm, del cual hasta el momento no se han descrito mecanismos de resistencia (Percival et al., 2016). Como era de esperar, debido a sus propiedades nanomoleculares que podrían facilitar una mayor penetración en la matriz del biofilm y una mejor interacción con las células bacterianas, el complejo de Ag-sulfamoxazol mostro muy buenos resultados, tanto en la inhibición como en la erradicación del biofilm. La nanotecnología aplicada a compuestos antimicrobianos ha demostrado mejorar la biodisponibilidad y la estabilidad de los principios activos, lo que podría explicar el desempeño superior de este complejo de plata en comparación con los demás compuestos evaluados (Chegini et al., 2024) (Hetta et al., 2023). Por otro lado, si bien el complejo Ag-Sulfaclopiridazina logro erradicar le biofilm, el Ag-SCN-SCP alcanzo un porcentaje de erradicación mayor, lo que podría deberse a diferencias en su estabilidad o en su mecanismo de acción dentro del biofilm.

En el caso de las sulfonamidas de Cu, los resultados mostraron una capacidad de erradicación moderada, y baja capacidad de inhibición. Esta menor eficacia en comparación con las sulfonamidas de Ag podría estar relacionada con diferencias en la forma en que estos compuestos interaccionan con la matriz del biofilm y las células embebidas en él, así como diferencias en la acción del metal con el que están acomplejados. No existe en la literatura un reporte sobre la acción de estos compuestos sobre el biofilm de *Kp*, sin embargo, Bonez y colaboradores evaluaron la actividad de algunos complejos metálicos de sulfametoxazol y sulfadiazina sobre el biofilm de algunas especies de micobacterias. En este estudio los complejos de cobre mostraron una capacidad variable de inhibir el biofilm a concentraciones subinhibitorias, y fueron incapaces de destruir el biofilm formado (Bonez et al., 2021). En este trabajo los autores sugieren que la inhibición de biofilm por estos compuestos podría estar relacionado con la inhibición de la síntesis de c-di-GMP, una molécula clave en la regulación de biofilms.

Por otro lado, los complejos polioles metálicos presentaron resultados variables tanto en la inhibición como en la erradicación del biofilm, con algunos, como Cu-Sorbitol, alcanzando más

del 50% de erradicación en concentraciones de 2 y 1  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que otros, como Zn-Xylitol, no solo fueron ineficaces, sino que incluso promovieron la formación de biofilm. Cabe destacar que los ligandos de los polioles metálicos son altamente hidrofílicos. Si bien su complejación con metales aumenta su liposolubilidad, la presencia de múltiples grupos hidroxilo (-OH) podría restringir su capacidad de penetración en las células bacterianas o el matriz extracelular del biofilm, provocando una menor eficacia en la inhibición del biofilm.

La sobreproducción de biofilm observada en algunos casos podría deberse a la toxicidad del compuesto para la bacteria, lo que activaría un mecanismo de defensa en el que se promueve la formación de biofilm. En este contexto, la bacteria podría estar favoreciendo su transición de la forma planctónica, más vulnerable, hacia la forma de biofilm, que le proporciona mayor protección frente al agente antimicrobiano. Un estudio demostró que concentración subinhibitorias de algunos antibióticos inducen un aumento en la producción de biofilm en *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* mediante alteración en los niveles de c-di-GMP (Hoffman et al., 2005). Otro estudio observó que la exposición a concentraciones subletales de inhibidores de la síntesis de la pared celular aumenta la formación de biofilm en *Enterococcus faecalis* (Yu et al., 2018). Son varios los estudios que sugieren que la exposición a agentes antimicrobianos puede inducir la formación de biofilms como una estrategia de supervivencia bacteriana (Kaplan, 2011) (Andersson & Hughes, 2014).

Los resultados obtenidos resaltan la importancia de considerar no solo la actividad antimicrobiana de los compuestos, sino también su interacción con la estructura del biofilm y su capacidad de penetración en la matriz extracelular. Los resultados obtenidos son promisorios, especialmente en el caso de los complejos de Ag con sulfonamidas, que mostraron una mayor capacidad de erradicación del biofilm. Sin embargo, es fundamental realizar ensayos adicionales con los ligandos libres por separado para evaluar si la actividad observada es atribuible al complejo como tal y no de sus ligandos. Además, futuros estudios deberán incluir ensayos con más aislamientos de *Kp* multirresistente, utilizando los compuestos más prometedores, con el objetivo de validar su efectividad en contextos clínicos. La nanotecnología parece desempeñar un papel clave en la eficacia de ciertos compuestos, lo que sugiere que explorar esta línea de investigación podría ofrecer nuevas estrategias para el control de infecciones asociadas a biofilms bacterianos.

## Conclusiones

En esta tesis se secuenciaron cinco genomas completos de *Kp* de origen clínico mediante las tecnologías Illumina y Nanopore. Se lograron ensamblajes de alta calidad al pulir las lecturas Nanopore con las de Illumina, obteniéndose genomas circulares y cerrados.

El análisis genómico permitió correlacionar el perfil fenotípico de resistencia con el genotípico en todos los aislamientos. La detección de un aislamiento de *Kp* pan-resistente (Kp23), incluyendo resistencia a colistina, es motivo de gran preocupación clínica. Siendo que la colistina es utilizada como terapia de último recurso para el tratamiento de infecciones por *Kp* resistente a carbapenémicos en Uruguay.

El análisis MLST reveló la presencia de dos clones diferentes, el secuenciotipo ST437 en los aislamientos productores de KPC-2 y el secuenciotipo ST307 en los productores de NDM-5. La detección del secuenciotipo ST307 portador de *bla*<sub>NDM-5</sub> en Uruguay amerita la vigilancia epidemiológica y el control en los centros de salud para prevenir su diseminación.

La diferencia de dos bandas en el perfil de restricción de PFGE de los aislamientos 54-1 y 54-2, obtenidos simultáneamente de la herida operatoria de un mismo paciente y que presentan fenotipos distintos, indica que estos están estrechamente relacionados. El uso de herramienta genética más sensible como el cgMLST y número de SNP demostró que los aislamientos pertenecían a la misma clona.

Los plásmidos multirreplicones analizados en este estudio que albergan *bla*<sub>NDM-5</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub> contienen un gran número de genes de resistencia a antibióticos, organizados en plataformas genéticas complejas. La transferencia de estos genes conlleva la co-transferencia de múltiples genes que confieren resistencia quinolonas, aminoglucósidos y trimetoprima/sulfametoxazol. Esta situación resalta la importancia de la vigilancia epidemiológica y el fortalecimiento de las estrategias de control en el ámbito de la salud, con el fin de prevenir la diseminación de estos patógenos y optimizar el manejo de infecciones por bacterias multirresistentes.

Se demostró que todos los aislamientos analizados fueron capaces de formar biofilm, con variaciones en la intensidad de su producción, siendo los aislamientos ST437 los que mostraron una mayor capacidad. No se identificaron genes específicos en el genoma que expliquen esta

diferencia, lo que sugiere que podría estar asociada a genes aún desconocidos o a mecanismos que involucren diferencias en la expresión génica.

Se evaluó la capacidad de compuestos metálicos y colistina para inhibir y/o erradicar el biofilm de *Kp*. La colistina demostró inhibir la formación de biofilm a concentraciones sub inhibitorias, con una mayor eficacia en los aislamientos resistentes a este antibiótico.

Entre los complejo metálicos evaluados, las sulfonamidas de plata mostraron los mejores resultados tanto en la inhibición como en la erradicación del biofilm en las condiciones ensayadas, lo que sugiere su potencial como estrategia complementaria para el control de infecciones causadas por estas bacterias multirresistentes. Para confirmar su eficacia antibiofilm, sería necesario evaluar los compuestos más prometedores en un mayor número de aislamientos clínicos de *Kp*.

En el contexto de la terapia clínica, es fundamental comprender los mecanismos de acción de los agentes antibiofilm. Por ello, se sugiere continuar investigando aquellos compuestos con potencial antibiofilm, con el objetivo de dilucidar sus mecanismos de acción, establecer sus rangos de toxicidad y determinar las vías de administración más eficientes.

## Anexo I: Primers y ciclos de PCR

|                           |                               |                        | Ciclo                        |                       |                 |                |                     |                 |
|---------------------------|-------------------------------|------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|---------------------|-----------------|
| Gen                       | Primers                       | PM<br>producto<br>(pb) | Pre<br>desnatura<br>lizacion | Desnatur<br>alizacion | hibrida<br>cion | Extensio<br>n  | Extensi<br>on final | Nº de<br>ciclos |
| <i>mcr</i>                | FW-TGCAGCATACTTCTGTGTGG       | 1626                   | 94°C,<br>5min                | 94°C,<br>1min         | 56°C, 1<br>min  | 72°C,<br>3 min | 72°C, 5<br>min      | 35              |
|                           | RV-TATCGGTTGCCATTGGCGTG       |                        |                              |                       |                 |                |                     |                 |
| <i>mgrB</i>               | FW-AAGGCGTTCATTCTACCACC       | 144                    | 94°C,<br>5min                | 94°C,<br>1min         | 56°C,<br>30 seg | 72°C,<br>1 min | 72°C, 5<br>min      | 35              |
|                           | RV-TTAAGAAGGCGGTGCTATCC       |                        |                              |                       |                 |                |                     |                 |
| <i>bla</i> <sup>NDM</sup> | FW-GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC      | 621                    | 94°C,<br>5min                | 94°C, 30<br>seg       | 52°C,<br>30 seg | 72°C,<br>1 min | 72°C, 5<br>min      | 35              |
|                           | RV-CGGAATGGCTCATCACGATC       |                        |                              |                       |                 |                |                     |                 |
| <i>rpoB</i> *             | FW-GGCGAAATGGCWGAGAACCA       | 1075                   | 94°C,<br>2min                | 94°C,<br>30seg        | 50°C,<br>1 min  | 72°C,<br>30seg | 72°C, 5<br>min      | 35              |
|                           | RV-GAGTCTTCGAAGTTGTAACC       |                        |                              |                       |                 |                |                     |                 |
| <i>gapA</i> *             | FW-TGAAATATGACTCCACTCACGG     | 662                    |                              |                       |                 |                |                     |                 |
|                           | RV-CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT   |                        |                              |                       |                 |                |                     |                 |
| <i>mdh</i> *              | FW-CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG     | 756                    |                              |                       |                 |                |                     |                 |
|                           | RV-CCGTTTTTCCCAGCAGCAG        |                        |                              |                       |                 |                |                     |                 |
| <i>pgi</i> *              | FW-GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC | 556                    |                              |                       |                 |                |                     |                 |
|                           | RV-CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT  |                        |                              |                       |                 |                |                     |                 |
| <i>phoE</i> *             | FW-ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG | 602                    |                              |                       |                 |                |                     |                 |
|                           | RV-TGATCAGAACTGGTAGGTGAT      |                        |                              |                       |                 |                |                     |                 |
| <i>infB</i> *             | FW-CTCGCTGCTGGACTATATTCG      | 462                    |                              |                       |                 |                |                     |                 |
|                           | RV-CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC      |                        |                              |                       |                 |                |                     |                 |
| <i>tonB</i> *             | FW-CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT   | 539                    |                              |                       |                 |                |                     |                 |
|                           | RV-ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG      |                        |                              |                       |                 |                |                     |                 |

\*Los primer utilizados para amplificar los genes MLST tienen una secuencia cebadora que precede al primer, llamada primer de secuenciación universal. **F:** GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA **R:** TTGTGAGCGGATAACAATTTC. Estos primers permiten que el ciclo utilizado para la amplificación sea el mismo para los 7 genes.

### Referencias:

Primers *mcr*: (Wong et al., 2016)

Primers *mgrB*: (Cannatelli et al., 2013)

Primers *bla<sub>NDM</sub>*: (Poirel et al., 2011)

Primers MLST: Obtenido de la página web del *Institut Pasteur* de Francia, base de datos específica de *Klebsiella pneumoniae* <https://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella/primers-used>

# Bibliografía

- Abd El-Hamid, M. I., Y. El-Naenaeey, E., M kandeel, T., Hegazy, W. A. H., Mosbah, R. A., Nassar, M. S., Bakhrebah, M. A., Abdulaal, W. H., Alhakamy, N. A., & Bendary, M. M. (2020). Promising Antibiofilm Agents: Recent Breakthrough against Biofilm Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 9(10), 667. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100667>
- Acevedo Cepeda, D., Chaparro Lozano, D., Serrato Ladino, K. N., Rincón-Riveros, A., Cepeda, A., Lozano, C., & Ladino, S. (2021). New beta-lactamase inhibitors: current status and application in practice. *Hechos Microbiol*, 12(1), pp-pp. <https://doi.org/10.17533/udea.hm.v12n1a05>
- Alexander, J. W. (2009). History of the Medical Use of Silver. *Surgical Infections*, 10(3), 289–292. <https://doi.org/10.1089/sur.2008.9941>
- Alikhan, N.-F., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L., & Beatson, S. A. (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics*, 12(1), 402. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-402>
- Alisigwe, C. V., Ikpa, C. S., & Otuonye, U. J. (2025). Examining alternative approaches to antibiotic utilisation: A critical evaluation of phage therapy and antimicrobial peptides combination as potential alternatives. *The Microbe*, 6, 100254. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100254>
- Allscher, T., Kästle, X., Kettenbach, G., Klüfers, P., & Kunte, T. (2007). Sugar-Alcohol Complexes of Palladium(II): On the Variable Rigidity of Open-Chain Carbohydrate Ligands. *Chemistry – An Asian Journal*, 2(8), 1037–1045. <https://doi.org/10.1002/asia.200700094>
- Alvarez, C., Nastro, M., Goyheneche, B., Potente, N., Ledesma, M., Vay, C., Naas, T., Foccoli, M., de Gregorio, S., Famiglietti, A., Dabos, L., & Rodriguez, C. H. (2024). NDM-5-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 in a university hospital in Argentina. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 79(12), 3174–3177. <https://doi.org/10.1093/jac/dkae337>
- Álvarez, V. E., Carrera Páez, L., Piekar, M., García Allende, N., Campos, J., Mendiando, N., Aguilar, A., Fox, B., Fernández-Canigia, L., Quiroga, M. P., & Centrón, D. (2024). Genomic Characterization of Two NDM-5-Producing Isolates of *Klebsiella pneumoniae* ST11 from a Single Patient. *Current Microbiology*, 81(3), 76. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03596-3>
- Ambler, R. P. (1980). The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289(1036), 321–331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Amereh, F., Arabestani, M., & Shokoohizadeh, L. (2023). Relationship of OqxAB efflux pump to antibiotic resistance, mainly fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*, isolated from hospitalized patients. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 26(1), 93–98.
- Ammons, M. C. B., Ward, L. S., Fisher, S. T., Wolcott, R. D., & James, G. A. (2009). In vitro susceptibility of established biofilms composed of a clinical wound isolate of *Pseudomonas aeruginosa* treated with lactoferrin and xylitol. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(3), 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.08.013>

- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 12(7), 465–478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3270>
- Andrade, L. N., Curiao, T., Ferreira, J. C., Longo, J. M., Clímaco, E. C., Martinez, R., Bellissimo-Rodrigues, F., Basile-Filho, A., Evaristo, M. A., Del Peloso, P. F., Ribeiro, V. B., Barth, A. L., Paula, M. C., Baquero, F., Cantón, R., Darini, A. L. da C., & Coque, T. M. (2011). Dissemination of *bla*<sub>KPC-2</sub> by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3579–3583. <https://doi.org/10.1128/AAC.01783-10>
- Aranaga, C., Pantoja, L. D., Martínez, E. A., & Falco, A. (2022). Phage Therapy in the Era of Multidrug Resistance in Bacteria: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4577. <https://doi.org/10.3390/ijms23094577>
- Arena, F., Henrici De Angelis, L., D'Andrea, M. M., Cannatelli, A., Fossati, L., Di Pilato, V., Giani, T., Cavallo, R., & Rossolini, G. M. (2017). Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with hypermucoviscous phenotype: A case report and literature review. *Virulence*, 8(8), 1900–1908. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1286439>
- ASSEV, S., WÅLER, S. M., & RÖLLA, G. (1983). FURTHER STUDIES ON THE GROWTH INHIBITION OF SOME ORAL BACTERIA BY XYLITOL. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology*, 91B(1–6), 261–265. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1983.tb00044.x>
- ATCC® 15380™. (2023). *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (ATCC® 15380™). <https://Genomes.Atcc.Org/Genomes/F5f88cd8ab1748a8>. <https://genomes.atcc.org/genomes/f5f88cd8ab1748a8>.
- ATCC® 700721™. (2022). *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* (ATCC® 700721™). <https://Genomes.Atcc.Org/Genomes/567305f3e3f949de>.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E. M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G. J., Olson, R., Osterman, A. L., Overbeek, R. A., McNeil, L. K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., ... Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>
- Bagel, S., Hüllen, V., Wiedemann, B., & Heisig, P. (1999). Impact of *gyrA* and *parC* Mutations on Quinolone Resistance, Doubling Time, and Supercoiling Degree of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), 868–875. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.868>
- Balestrino, D., Haagensen, J. A. J., Rich, C., & Forestier, C. (2005). Characterization of Type 2 Quorum Sensing in *Klebsiella pneumoniae* and Relationship with Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, 187(8), 2870–2880. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2870-2880.2005>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal of Computational Biology*, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>

- Baquero, F., Martínez, J. L., F. Lanza, V., Rodríguez-Beltrán, J., Galán, J. C., San Millán, A., Cantón, R., & Coque, T. M. (2021). Evolutionary Pathways and Trajectories in Antibiotic Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00050-19>
- Barras, F., Aussel, L., & Ezraty, B. (2018). Silver and Antibiotic, New Facts to an Old Story. *Antibiotics*, 7(3), 79. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030079>
- Bevan, E. R., Jones, A. M., & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2145–2155. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx146>
- Bi, Y., Xia, G., Shi, C., Wan, J., Liu, L., Chen, Y., Wu, Y., Zhang, W., Zhou, M., He, H., & Liu, R. (2021). Therapeutic strategies against bacterial biofilms. *Fundamental Research*, 1(2), 193–212. <https://doi.org/10.1016/j.fmre.2021.02.003>
- Boattini, M., Gaibani, P., Comini, S., Costa, C., Cavallo, R., Broccolo, F., & Bianco, G. (2025). In vitro activity and resistance mechanisms of novel antimicrobial agents against metallo- $\beta$ -lactamase producers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 44(5), 1041–1068. <https://doi.org/10.1007/s10096-025-05080-1>
- Bonez, P. C., Agertt, V. A., Rossi, G. G., dos Santos Siqueira, F., Siqueira, J. D., Marques, L. L., de Oliveira, G. N. M., Santos, R. C. V., & de Campos, M. M. A. (2021). Sulfonamides complexed with metals as mycobacterial biofilms inhibitors. *Journal of Clinical Tuberculosis and Other Mycobacterial Diseases*, 23, 100217. <https://doi.org/10.1016/j.jctube.2021.100217>
- Bonnin, R. A., Poirel, L., Carattoli, A., & Nordmann, P. (2012). Characterization of an IncFII Plasmid Encoding NDM-1 from Escherichia coli ST131. *PLoS ONE*, 7(4), e34752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034752>
- Bougnom, B. P., Thiele-Bruhn, S., Ricci, V., Zongo, C., & Piddock, L. J. V. (2020). Raw wastewater irrigation for urban agriculture in three African cities increases the abundance of transferable antibiotic resistance genes in soil, including those encoding extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). *Science of The Total Environment*, 698, 134201. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134201>
- Bowers, J. R., Kitchel, B., Driebe, E. M., MacCannell, D. R., Roe, C., Lemmer, D., de Man, T., Rasheed, J. K., Engelthaler, D. M., Keim, P., & Limbago, B. M. (2015). Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 Klebsiella pneumoniae Pandemic. *PLOS ONE*, 10(7), e0133727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133727>
- Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933–951. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
- Brisse, S., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2006). The Genus Klebsiella. In *The Prokaryotes* (pp. 159–196). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X\\_8](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_8)
- Bukhari, A. I., Shapiro, J. A., & Adhya, S. L. (1977). *DNA: Insertion Elements, Plasmids, and Episomes*.
- Cannatelli, A., D'Andrea, M. M., Giani, T., Di Pilato, V., Arena, F., Ambretti, S., Gaibani, P., & Rossolini, G. M. (2013). In Vivo Emergence of Colistin Resistance in Klebsiella pneumoniae Producing KPC-Type Carbapenemases Mediated by Insertional Inactivation

- of the PhoQ/PhoP *mgrB* Regulator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(11), 5521–5526. <https://doi.org/10.1128/AAC.01480-13>
- Carattoli, A. (2009). Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227–2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>
- Carr, H. S., Wlodkowski, T. J., & Rosenkranz, H. S. (1973). Silver Sulfadiazine: In Vitro Antibacterial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4(5), 585–587. <https://doi.org/10.1128/AAC.4.5.585>
- Carver, T. J., Rutherford, K. M., Berriman, M., Rajandream, M.-A., Barrell, B. G., & Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics*, 21(16), 3422–3423. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti553>
- Casin, I., Bordon, F., Bertin, P., Coutrot, A., Podglajen, I., Brasseur, R., & Collatz, E. (1998). Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase Variants of the Ib Type with Altered Substrate Profile in Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(2), 209–215. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.2.209>
- Castrillon, L., & Ramos, A. P. (2010). Importance of biofilms in medical practice. *Dermatologia Revista Mexicana*, 54, 14–24.
- Cejas, D., Elena, A., Guevara Nuñez, D., Sevillano Platero, P., De Paulis, A., Magariños, F., Alfonso, C., Berger, M. A., Fernández-Canigia, L., Gutkind, G., & Radice, M. (2019). Changing epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Argentina: Emergence of hypermucoviscous ST25 and high-risk clone ST307. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 18, 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.005>
- Chandraleka, S., Ramya, K., Chandramohan, G., Dhanasekaran, D., Priyadharshini, A., & Panneerselvam, A. (2014). Antimicrobial mechanism of copper (II) 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridyl complex on bacterial and fungal pathogens. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(6), 953–962. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.11.020>
- Chang, L., Bastian, I., & Warner, M. (2013). Survey of *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia in two South Australian hospitals and detection of hypermucoviscous phenotype and *magA/rmpA* genotypes in *K. pneumoniae* isolates. *Infection*, 41(2), 559–563. <https://doi.org/10.1007/s15010-012-0374-y>
- Chegini, Z., Shariati, A., Alikhani, M. Y., Safaiee, M., Rajaeih, S., Arabestani, M., & Azizi, M. (2024). Antibacterial and antibiofilm activity of silver nanoparticles stabilized with C-phycocyanin against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1455385>
- Chen, L., Anderson, & Paterson. (2012). Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infection and Drug Resistance*, 133. <https://doi.org/10.2147/IDR.S26613>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Chirabhundhu, N., Luk-In, S., Phuadraksa, T., Wichit, S., Chatsuwan, T., Wannigama, D. L., & Yainoy, S. (2024). Occurrence and mechanisms of tigecycline resistance in carbapenem-

- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Thailand. *Scientific Reports*, 14(1), 5215. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55705-2>
- Choby, J. E., Howard-Anderson, J., & Weiss, D. S. (2020). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. *Journal of Internal Medicine*, 287(3), 283–300. <https://doi.org/10.1111/joim.13007>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2023). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Vol. CLSI supplement M100* (33 ed.).
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2025). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Vol. CLSI supplement M100* (35 ed.).
- Comas, I., & Gil, A. (2016). Secuenciación masiva para el diagnóstico y la epidemiología de tuberculosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34, 32–39. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(16\)30217-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(16)30217-8)
- Cotton, F. A., & Wilkinson, G. (1996). *Química Inorgánica Avanzada* (LIMUSA).
- Danish, M., Raza, M. A., Khalid, H., Iftikhar, U., & Arshad, M. N. (2021). New metal complexes of sulfonamide: Synthesis, characterization, in-vitro anticancer, anticholinesterase, antioxidant, and antibacterial studies. *Applied Organometallic Chemistry*, 35(1). <https://doi.org/10.1002/aoc.6033>
- de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., & Hancock, R. E. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 580–589. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.013>
- Decker, E., Maier, G., Axmann, D., Brex, M., & von Ohle, C. (2008). Effect of xylitol/chlorhexidine versus xylitol or chlorhexidine as single rinses on initial biofilm formation of cariogenic streptococci. *Quintessence International*, 39, 17–22.
- DeLeo, F. R., Chen, L., Porcella, S. F., Martens, C. A., Kobayashi, S. D., Porter, A. R., Chavda, K. D., Jacobs, M. R., Mathema, B., Olsen, R. J., Bonomo, R. A., Musser, J. M., & Kreiswirth, B. N. (2014). Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(13), 4988–4993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321364111>
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A. D., & Brisse, S. (2005). Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 4178–4182. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>
- Díaz Q, P., Bello T, H., Domínguez Y, M., Trabal F, N., Mella M, S., Zemelman Z, R., & González R, G. (2004). Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Revista Médica de Chile*, 132(10). <https://doi.org/10.4067/S0034-98872004001000003>
- Doi, Y., Wachino, J., & Arakawa, Y. (2016). Aminoglycoside Resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), 523–537. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011>
- Doménech-Sánchez, A., Hernández-Allés, S., Martínez-Martínez, L., Benedí, V. J., & Albertí, S. (1999). Identification and Characterization of a New Porin Gene of *Klebsiella pneumoniae*: Its Role in  $\beta$ -Lactam Antibiotic Resistance. *Journal of Bacteriology*, 181(9), 2726–2732. <https://doi.org/10.1128/JB.181.9.2726-2732.1999>

- Doorduyn, D. J., Rooijackers, S. H. M., van Schaik, W., & Bardoel, B. W. (2016). Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiology*, 221(10), 1102–1109. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.06.014>
- Dosler, S., Karaaslan, E., & Alev Gerciker, A. (2016). Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. *Journal of Chemotherapy*, 28(2), 95–103. <https://doi.org/10.1179/1973947815Y.0000000004>
- Doumith, M., Findlay, J., Hirani, H., Hopkins, K. L., Livermore, D. M., Dodgson, A., & Woodford, N. (2017). Major role of pKpQIL-like plasmids in the early dissemination of KPC-type carbapenemases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2241–2248. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx141>
- Eftekhari, F., & Seyedpour, S. M. (2015). Prevalence of qnr and aac(6')-Ib-cr Genes in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 40(6), 515–521.
- Eikmeyer, F., Hadiati, A., Szczepanowski, R., Wibberg, D., Schneiker-Bekel, S., Rogers, L. M., Brown, C. J., Top, E. M., Pühler, A., & Schlüter, A. (2012). The complete genome sequences of four new IncN plasmids from wastewater treatment plant effluent provide new insights into IncN plasmid diversity and evolution. *Plasmid*, 68(1), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2012.01.011>
- El-Gebaly, E., Farrag, M., Dishisha, T., & Bakeer, W. (2021). Characterization of Aminoglycoside Modifying Enzymes Producing *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(4), 2420–2430. <https://doi.org/10.22207/JPAM.15.4.68>
- Escandón-Vargas, K., Reyes, S., Gutiérrez, S., & Villegas, M. V. (2017). The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 15(3), 277–297. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268918>
- EUCAST. (2022). *Colistin Breakpoints, Guidance document 2022*.
- EUCAST, & CLSI. (2016). *Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) As recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group*.
- Evans, A., & Kavanagh, K. A. (2021). Evaluation of metal-based antimicrobial compounds for the treatment of bacterial pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 70(5). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001363>
- Ferreira, L., Pos, E., Nogueira, D. R., Ferreira, F. P., Sousa, R., & Abreu, M. A. (2024). Antibiotics with antibiofilm activity – rifampicin and beyond. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1435720>
- Fleeman, R., IV, R. B., Cella, E., Azarian, T., & Rendueles, O. (2024). *Diverse polysaccharide production and biofilm formation abilities of clinical Klebsiella pneumoniae*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4630973/v1>
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623–633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Frei, A. (2020). Metal Complexes, an Untapped Source of Antibiotic Potential? *Antibiotics*, 9(2), 90. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020090>
- Frei, A., Zuegg, J., Elliott, A. G., Baker, M., Braese, S., Brown, C., Chen, F., G. Dowson, C., Dujardin, G., Jung, N., King, A. P., Mansour, A. M., Massi, M., Moat, J., Mohamed, H. A.,

- Renfrew, A. K., Rutledge, P. J., Sadler, P. J., Todd, M. H., ... Blaskovich, M. A. T. (2020). Metal complexes as a promising source for new antibiotics. *Chemical Science*, *11*(10), 2627–2639. <https://doi.org/10.1039/C9SC06460E>
- Galimand, M., Courvalin, P., & Lambert, T. (2003). Plasmid-Mediated High-Level Resistance to Aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* Due to 16S rRNA Methylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *47*(8), 2565–2571. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2565-2571.2003>
- Gamal, D., Fernández-Martínez, M., Salem, D., El-Defrawy, I., Montes, L. Á., Ocampo-Sosa, A. A., & Martínez-Martínez, L. (2016). Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Egypt containing bla NDM-1 on IncR plasmids and its association with rmtF. *International Journal of Infectious Diseases*, *43*, 17–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.12.003>
- Gao, L., Tan, Y., Zhang, X., Hu, J., Miao, Z., Wei, L., & Chai, T. (2015). Emissions of *Escherichia coli* Carrying Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Resistance from Pig Farms to the Surrounding Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *12*(4), 4203–4213. <https://doi.org/10.3390/ijerph120404203>
- García, J., Fresnadillo, M., Arce, J., & García, E. (1999). *Antibióticos betalactámicos*. (J. García Sánchez, R. López, & J. Prieto, Eds.; 1st ed.).
- García-Fulgueiras, V., Magallanes, C., Reyes, V., Cayota, C., Galiana, A., Vieytes, M., Vignoli, R., & Márquez, C. (2020). *In Vivo* High Plasticity of Multi-Drug Resistant ST258 *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance*, *27*(8), 1126–1130. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0310>
- Gasink, L. B., Edelstein, P. H., Lautenbach, E., Synnestvedt, M., & Fishman, N. O. (2009). Risk Factors and Clinical Impact of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, *30*(12), 1180–1185. <https://doi.org/10.1086/648451>
- Gharbi, M., Abbas, M. A. S., Hamrouni, S., & Maaroufi, A. (2023). First Report of aac(6')-Ib and aac(6')-Ib-cr Variant Genes Associated with Mutations in gyrA Encoded Fluoroquinolone Resistance in Avian *Campylobacter coli* Strains Collected in Tunisia. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(22), 16116. <https://doi.org/10.3390/ijms242216116>
- Gomes, I. B., Simões, M., & Simões, L. C. (2020). Copper Surfaces in Biofilm Control. *Nanomaterials*, *10*(12), 2491. <https://doi.org/10.3390/nano10122491>
- Gómez, J., García-Vázquez, E., & Hernández-Torres, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*, *28*(1), 1–9.
- González, A., & Nieves, B. (2016). Resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en dos unidades de cuidados intensivos del Hospital Universitario de Los Andes Mérida, Venezuela, entre 2007 y 2009. *Revista Médica UIS*, *29*(2). <https://doi.org/10.18273/revmed.v29n2-2016002>
- González, M. J., Robino, L., Iribarnegaray, V., Zunino, P., & Scavone, P. (2017). Effect of different antibiotics on biofilm produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection. *Pathogens and Disease*, *75*(4). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx053>

- González Rojas. (2013). *Síntesis de materiales bactericidas basados en nanopartículas metálicas y biopolímeros para terapia periodontal odontológica*.  
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/117430>
- González-Espinosa, F., Di Pilato, V., Magariños, F., Di Conza, J., Rossolini, G. M., Gutkind, G., Radice, M., & Cejas, D. (2024a). Genomic characterization of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 revealed multiple introductions in Buenos Aires, Argentina. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 37, 176–178.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.03.017>
- González-Espinosa, F., Di Pilato, V., Magariños, F., Di Conza, J., Rossolini, G. M., Gutkind, G., Radice, M., & Cejas, D. (2024b). Genomic characterization of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 revealed multiple introductions in Buenos Aires, Argentina. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 37, 176–178.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.03.017>
- Guducuoglu, H., Gursoy, N. C., Yakupogullari, Y., Parlak, M., Karasin, G., Sunnetcioglu, M., & Otlu, B. (2018). Hospital Outbreak of a Colistin-Resistant, NDM-1- and OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* : High Mortality from Pandrug Resistance. *Microbial Drug Resistance*, 24(7), 966–972. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0173>
- Guerra, M. E. S., Destro, G., Vieira, B., Lima, A. S., Ferraz, L. F. C., Hakansson, A. P., Darrieux, M., & Converso, T. R. (2022). *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.877995>
- Guilhen, C., Miquel, S., Charbonnel, N., Joseph, L., Carrier, G., Forestier, C., & Balestrino, D. (2019). Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 5(1), 25. <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0098-1>
- Hadjadj, L., Cassir, N., Saïdani, N., Hoffman, C., Brouqui, P., Astoul, P., Rolain, J.-M., & Baron, S. A. (2022). Outbreak of carbapenem-resistant enterobacteria in a thoracic-oncology unit through clonal and plasmid-mediated transmission of the blaOXA-48 gene in Southern France. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1048516>
- Haeili, M., Javani, A., Moradi, J., Jafari, Z., Feizabadi, M. M., & Babaei, E. (2017). MgrB Alterations Mediate Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Iran. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02470>
- Hagiya, H., Watanabe, N., Maki, M., Murase, T., & Otsuka, F. (2014). Clinical utility of string test as a screening method for hypermucoviscosity-phenotype *Klebsiella pneumoniae*. *Acute Medicine & Surgery*, 1(4), 245–246. <https://doi.org/10.1002/ams2.40>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2), 95–108.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hangan, A. C., Turza, A., Stan, R. L., Sevastre, B., Páll, E., Ceteian, S., & Oprean, L. S. (2016). Synthesis, crystal structure and characterization of new biologically active Cu(II) complexes with ligand derived from N-substituted sulfonamide. *Journal of Chemical Sciences*, 128(5), 815–824. <https://doi.org/10.1007/s12039-016-1077-1>

- Hao, Z., Wang, M., Cheng, L., Si, M., Feng, Z., & Feng, Z. (2024). Synergistic antibacterial mechanism of silver-copper bimetallic nanoparticles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1337543>
- Hetta, H. F., Ramadan, Y. N., Al-Harbi, A. I., A. Ahmed, E., Battah, B., Abd Ellah, N. H., Zanetti, S., & Donadu, M. G. (2023). Nanotechnology as a Promising Approach to Combat Multidrug Resistant Bacteria: A Comprehensive Review and Future Perspectives. *Biomedicines*, 11(2), 413. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020413>
- Hirsch, E. B., & Tam, V. H. (2010). Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(6), 1119–1125. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq108>
- Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., & Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436(7054), 1171–1175. <https://doi.org/10.1038/nature03912>
- Horng, Y.-T., Panjaitan, N. S. D., Tsai, Y.-J., Su, P.-W., Yang, H.-C., & Soo, P.-C. (2023). The role of EII complex in the bacterial responses to the glucose-survey in clinical Klebsiella pneumoniae isolates. *PLOS ONE*, 18(8), e0289759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289759>
- Hornsey, M., Phee, L., & Wareham, D. W. (2011a). A Novel Variant, NDM-5, of the New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase in a Multidrug-Resistant Escherichia coli ST648 Isolate Recovered from a Patient in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5952–5954. <https://doi.org/10.1128/AAC.05108-11>
- Hornsey, M., Phee, L., & Wareham, D. W. (2011b). A Novel Variant, NDM-5, of the New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase in a Multidrug-Resistant Escherichia coli ST648 Isolate Recovered from a Patient in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5952–5954. <https://doi.org/10.1128/AAC.05108-11>
- Hošťacká, A., & Čížnár, I. (2008). Aminoglycosides and Colistin Inhibit Biofilm Formation in Klebsiella pneumoniae. *Epidemiology, Microbiology, Immunology*, 3, 101–105.
- Hu, X., Yang, L., Dong, N., Lin, Y., Zhang, L., Wang, X., Guo, X., Xiang, Y., Jin, L., Zhang, C., Sun, Y., Qiu, S., Li, P., & Song, H. (2022). Dissemination of bla<sub>NDM-5</sub> in Escherichia coli through the IncX3 Plasmid from Different Regions in China. *Microbial Drug Resistance*, 28(4), 453–460. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0202>
- Huamán, J., Espejo, G., & Navarrete, Estefany. (2024). Mecanismos antibacterianos de nanopartículas de plata obtenidas por síntesis química: una revisión. *Arnaldoa*, 31, 171–185.
- Huang, Y.-S., Chen, P.-Y., Chou, P.-C., & Wang, J.-T. (2023). In Vitro Activities and Inoculum Effects of Cefiderocol and Aztreonam-Avibactam against Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Microbiology Spectrum*, 11(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00569-23>
- Ignatova, N., Abidullina, A., Streltsova, O., Elagin, V., & Kamensky, V. (2023). Effect of pH, Norepinephrine and Glucose on Metabolic and Biofilm Activity of Uropathogenic Microorganisms. *Microorganisms*, 11(4), 862. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11040862>
- Jacoby, G. A., Walsh, K. E., Mills, D. M., Walker, V. J., Oh, H., Robicsek, A., & Hooper, D. C. (2006). qnrB, Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. *Antimicrobial*

- Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1178–1182. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1178-1182.2006>
- Jalil, A. T., Alrawe, R. T. A., Al-Saffar, M. A., Shaghnab, M. L., Merza, M. S., Abosaooda, M., & Latef, R. (2024). The use of combination therapy for the improvement of colistin activity against bacterial biofilm. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55(1), 411–427. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01189-7>
- Janssen, A. B., Doorduyn, D. J., Mills, G., Rogers, M. R. C., Bonten, M. J. M., Rooijackers, S. H. M., Willems, R. J. L., Bengoechea, J. A., & van Schaik, W. (2020). Evolution of Colistin Resistance in the *Klebsiella pneumoniae* Complex Follows Multiple Evolutionary Trajectories with Variable Effects on Fitness and Virulence Characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01958-20>
- Jiang, Y., Wei, Z., Wang, Y., Hua, X., Feng, Y., & Yu, Y. (2015). Tracking a hospital outbreak of KPC-producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* with whole genome sequencing. *Clinical Microbiology and Infection*, 21(11), 1001–1007. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.07.001>
- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-Induced Biofilm Formation. *The International Journal of Artificial Organs*, 34(9), 737–751. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000027>
- Kazmierczak, K. M., Biedenbach, D. J., Hackel, M., Rabine, S., de Jonge, B. L. M., Bouchillon, S. K., Sahm, D. F., & Bradford, P. A. (2016). Global Dissemination of *bla*<sub>KPC</sub> into Bacterial Species beyond *Klebsiella pneumoniae* and *In Vitro* Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam-Avibactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8), 4490–4500. <https://doi.org/10.1128/AAC.00107-16>
- Kirketerp-Møller, K., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2020). The zone model: A conceptual model for understanding the microenvironment of chronic wound infection. *Wound Repair and Regeneration*, 28(5), 593–599. <https://doi.org/10.1111/wrr.12841>
- Ko, K. S. (2017). The contribution of capsule polysaccharide genes to virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence*, 8(5), 485–486. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1240862>
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*, 37(5), 540–546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>
- Kragh, K. N., Hutchison, J. B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A. E. L., Irie, Y., Jensen, P. Ø., Diggle, S. P., Allen, R. J., Gordon, V., & Bjarnsholt, T. (2016). Role of Multicellular Aggregates in Biofilm Formation. *MBio*, 7(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00237-16>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lanter, B. B., Sauer, K., & Davies, D. G. (2014). Bacteria Present in Carotid Arterial Plaques Are Found as Biofilm Deposits Which May Contribute to Enhanced Risk of Plaque Rupture. *MBio*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/mBio.01206-14>
- Lat, A., Clock, S. A., Wu, F., Whittier, S., Della-Latta, P., Fauntleroy, K., Jenkins, S. G., Saiman, L., & Kubin, C. J. (2011). Comparison of Polymyxin B, Tigecycline, Cefepime, and Meropenem MICs for KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* by Broth Microdilution, Vitek

- 2, and Etest. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(5), 1795–1798.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.02534-10>
- Latorre-Barragan, M. F., Zurita-Leal, A. C., & Gudiño Gomezjurado, M. E. (2019).  $\beta$ -lactam antibiotics resistance in Latin American countries. *Medwave*, 19(10), e7729–e7729.  
<https://doi.org/10.5867/medwave.2019.10.7729>
- Lepe, J. A., & Martínez-Martínez, L. (2022). Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Medicina Intensiva*, 46(7), 392–402.  
<https://doi.org/10.1016/j.medin.2022.02.004>
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular Pathogenesis of *Klebsiella Pneumoniae*. *Future Microbiology*, 9(9), 1071–1081. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.48>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, H., Zhou, M., Chen, X., Zhang, Y., Jian, Z., Yan, Q., & Liu, W.-E. (2021). Comparative Evaluation of Seven Tigecycline Susceptibility Testing Methods for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Infection and Drug Resistance*, Volume 14, 1511–1516.  
<https://doi.org/10.2147/IDR.S289499>
- Li, W., Guo, H., Gao, Y., Yang, X., Li, R., Li, S., Sun, C., Du, W., Chen, S., Xu, P., Huang, W., Shi, J., Yi, X., & Li, X. (2022). Comparative genomic analysis of plasmids harboring blaOXA-48-like genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1082813>
- Libardo, M. D. J., Bahar, A. A., Ma, B., Fu, R., McCormick, L. E., Zhao, J., McCallum, S. A., Nussinov, R., Ren, D., Angeles-Boza, A. M., & Cotten, M. L. (2017). Nuclease activity gives an edge to host-defense peptide piscidin 3 over piscidin 1, rendering it more effective against persisters and biofilms. *The FEBS Journal*, 284(21), 3662–3683.  
<https://doi.org/10.1111/febs.14263>
- Lim, J. H., Jeong, Y., Song, S.-H., Ahn, J.-H., Lee, J. R., & Lee, S.-M. (2018). Penetration of an antimicrobial zinc-sugar alcohol complex into *Streptococcus mutans* biofilms. *Scientific Reports*, 8(1), 16154. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34366-y>
- Lin, N., Sha, Y., Zhang, G., Song, C., Zhang, Y., Zhao, J., Huang, D., Lu, J., Bao, Q., & Pan, W. (2024). APH(3')-Ie, an aminoglycoside-modifying enzyme discovered in a rabbit-derived *Citrobacter gillenii* isolate. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1435123>
- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L.-F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J.-H., & Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Livermore, D. M. (2012). Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 27(2), 128.  
<https://doi.org/10.3904/kjim.2012.27.2.128>
- Loh, B., Chen, J., Manohar, P., Yu, Y., Hua, X., & Leptihn, S. (2020). A Biological Inventory of Prophages in *A. baumannii* Genomes Reveal Distinct Distributions in Classes, Length, and

- Genomic Positions. *Frontiers in Microbiology*, 11.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.579802>
- Lora-Tamayo, J., Murillo, O., & Ariza, J. (2019). *Clinical Use of Colistin in Biofilm-Associated Infections* (pp. 181–195). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16373-0_13)
- Luterbach, C. L., Boshe, A., Henderson, H. I., Cober, E., Richter, S. S., Salata, R. A., Kalayjian, R. C., Watkins, R. R., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Rudin, S. D., Domitrovic, T. N., Doi, Y., Kaye, K. S., Evans, S., Fowler, V. G., Bonomo, R. A., & van Duin, D. (2019). The Role of Trimethoprim/Sulfamethoxazole in the Treatment of Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(1).  
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofy351>
- Magallanes, C., Eugster, E., Clavijo, F., Siri, M. I., Cantero, J., Echeverría, P., Torello, J., Castro, M., & Márquez, C. (2025). Emergence of Multidrug-Resistant NDM-5-Producing ST307 *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay, 2023. *Microbial Drug Resistance*.  
<https://doi.org/10.1089/mdr.2024.0065>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012a). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012b). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Malizos, KN., & Ioannou, M. (2014). *Bone-implant interface in biofilm-associated bone and joint infections* (1st ed.). Bone-implant interface in orthopedic surgery.
- Marín, M., & Gudiol, F. (2003). *Antibióticos betalactámicos*.
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- Medina, J. (2017). Actualización acerca de colistina (polimixina E): aspectos clínicos, PK/PD y equivalencias. *Revista Medica Del Uruguay*. <https://doi.org/10.29193/RMU.33.3.5>
- Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., & Gurevich, A. (2018). Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics*, 34(13), i142–i150.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty266>
- Ministerio de Salud Pública. (2024, June). *Respuesta y resolución 3133*. [Presentación En Línea]. [https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/2024-06/respuesta%20y%20resoluci%C3%B3n3133\\_removed.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/2024-06/respuesta%20y%20resoluci%C3%B3n3133_removed.pdf)
- Mizdal, C. R., Stefanello, S. T., da Costa Flores, V., Agertt, V. A., Bonez, P. C., Rossi, G. G., da Silva, T. C., Antunes Soares, F. A., de Lourenço Marques, L., & de Campos, M. M. A.

- (2018). The antibacterial and anti-biofilm activity of gold-complexed sulfonamides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, 123, 440–448. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.002>
- Mojica, M. F., Rossi, M.-A., Vila, A. J., & Bonomo, R. A. (2022). The urgent need for metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors: an unattended global threat. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(1), e28–e34. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30868-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30868-9)
- Moreno, S., Galvan, E., Fiorilli, G., & Martinez, N. (2015). Antibacterial efficacy of *Rosmarinus officinalis* phytochemicals against nosocomial multidrug-resistant bacteria grown in planktonic culture and biofilm. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (1st ed., pp. 3–8).
- Murri, R., Fiori, B., Spanu, T., Mastroianni, I., Giovannenze, F., Taccari, F., Palazzolo, C., Scoppettuolo, G., Ventura, G., Sanguinetti, M., Cauda, R., & Fantoni, M. (2017). Trimethoprim–sulfamethoxazole therapy for patients with carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: retrospective single-center case series. *Infection*, 45(2), 209–213. <https://doi.org/10.1007/s15010-016-0968-x>
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., Retaillieu, P., & Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 917–919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>
- Nadar, S., Khan, T., Patching, S. G., & Omri, A. (2022). Development of Antibiofilm Therapeutics Strategies to Overcome Antimicrobial Drug Resistance. *Microorganisms*, 10(2), 303. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020303>
- Nang, S. C., Han, M.-L., Yu, H. H., Wang, J., Torres, V. V. L., Dai, C., Velkov, T., Harper, M., & Li, J. (2019). Polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: multifaceted mechanisms utilized in the presence and absence of the plasmid-encoded phosphoethanolamine transferase gene *mcr-1*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(11), 3190–3198. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz314>
- Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Rodríguez-Cerrato, V., Ponte, M. C., & Soriano, F. (2008). Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 585–590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03791.x>
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- Nirwati, H., Sinanjung, K., Fahrurissa, F., Wijaya, F., Napitupulu, S., Hati, V. P., Hakim, M. S., Meliala, A., Aman, A. T., & Nuryastuti, T. (2019). Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proceedings*, 13(S11), 20. <https://doi.org/10.1186/s12919-019-0176-7>
- Nomiya, K., Kasuga, N. C., & Takayama, A. (2013). CHAPTER 7. *Synthesis, Structure and Antimicrobial Activities of Polymeric and Nonpolymeric Silver and other Metal Complexes* (pp. 156–207). <https://doi.org/10.1039/9781782624998-00156>

- Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T. (2009a). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(4), 228–236. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
- Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T. (2009b). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(4), 228–236. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70054-4)
- Núñez-Samudio, V., Pimentel-Peralta, G., Herrera, M., Pecchio, M., Quintero, J., & Landires, I. (2022). Molecular Genetic Epidemiology of an Emerging Antimicrobial-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clone (ST307) Obtained from Clinical Isolates in Central Panama. *Antibiotics*, 11(12), 1817. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121817>
- Olar, R., Badea, M., & Chifiriuc, M. C. (2022). Metal Complexes—A Promising Approach to Target Biofilm Associated Infections. *Molecules*, 27(3), 758. <https://doi.org/10.3390/molecules27030758>
- Oleksy-Wawrzyniak, M., Junka, A., Brożyna, M., Paweł, M., Kwiek, B., Nowak, M., Mączyńska, B., & Bartoszewicz, M. (2021). The In Vitro Ability of *Klebsiella pneumoniae* to Form Biofilm and the Potential of Various Compounds to Eradicate It from Urinary Catheters. *Pathogens*, 11(1), 42. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010042>
- O'Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Oxford Nanopore Technologies. (2020). *Medaka: Sequence correction provided by ONT Research*. <https://github.com/Nanoporetech/Medaka>
- Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Papa-Ezdra, R., Cordeiro, N. F., Ferreira, F., García-Fulgueiras, V., Araújo, L., Mota, M. I., Outeda, M., Seija, V., Vignoli, R., & Bado, I. (2024). First Detection of High-Level Aminoglycoside-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* Isolates Due to 16S rRNA Methyltransferases with and Without blaNDM in Uruguay. *Antibiotics*, 13(11), 1029. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13111029>
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Yeiser, B., Bonomo, M. D., Rice, L. B., & Bonomo, R. A. (2003). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(11), 3554–3560. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.11.3554-3560.2003>
- Pei, N., Sun, W., He, J., Li, Y., Chen, X., Liang, T., Kristiansen, K., Liu, W., & Li, J. (2022). Genome-wide association study of *Klebsiella pneumoniae* identifies variations linked to

- carbapenems resistance. *Frontiers in Microbiology*, 13.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.997769>
- Peirano, G., Bradford, P. A., Kazmierczak, K. M., Chen, L., Kreiswirth, B. N., & Pitout, J. D. D. (2017). Importance of Clonal Complex 258 and IncF<sub>K2-like</sub> Plasmids among a Global Collection of *Klebsiella pneumoniae* with *bla*<sub>KPC</sub>. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02610-16>
- Peirano, G., Chen, L., Kreiswirth, B. N., & Pitout, J. D. D. (2020). Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella pneumoniae* Clones ST307 and ST147. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.01148-20>
- Peona, V., Blom, M. P. K., Xu, L., Burri, R., Sullivan, S., Bunikis, I., Liachko, I., Haryoko, T., Jönsson, K. A., Zhou, Q., Irestedt, M., & Suh, A. (2021). Identifying the causes and consequences of assembly gaps using a multiplatform genome assembly of a bird-of-paradise. *Molecular Ecology Resources*, 21(1), 263–286. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13252>
- Percival, S. L., Finnegan, S., Donelli, G., Vuotto, C., Rimmer, S., & Lipsky, B. A. (2016). Antiseptics for treating infected wounds: Efficacy on biofilms and effect of pH. *Critical Reviews in Microbiology*, 42, 293–309. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.940495>
- Pereira, A. L., Vasconcelos, M. A., Andrade, A. L., Martins, I. M., Holanda, A. K. M., Gondim, A. C. S., Penha, D. P. S., Bruno, K. L., Silva, F. O. N., & Teixeira, E. H. (2023). Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Copper-Based Metallic Compounds Against Bacteria Related with Healthcare-Associated Infections. *Current Microbiology*, 80(4), 133. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03232-0>
- Pereira, P. S., de Araujo, C. F. M., Seki, L. M., Zahner, V., Carvalho-Assef, A. P. D., & Asensi, M. D. (2013). Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(2), 312–316. <https://doi.org/10.1093/jac/dks396>
- Perez, F., Endiamiani, A., Hujer, K., & Bonomo, R. (2007). The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(5), 459–469. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.08.003>
- Piperaki, E.-T., Syrogiannopoulos, G. A., Tzouveleakis, L. S., & Daikos, G. L. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(10), 1002–1005. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001675>
- Pitout, J. D. D., Nordmann, P., & Poirel, L. (2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 5873–5884. <https://doi.org/10.1128/AAC.01019-15>
- Pitout, J. D., & Laupland, K. B. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(3), 159–166. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(08\)70041-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(08)70041-0)
- Poirel, L., Bonnin, R. A., Boulanger, A., Schrenzel, J., Kaase, M., & Nordmann, P. (2012). Tn 125 -Related Acquisition of *bla*<sub>NDM</sub> -Like Genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 1087–1089. <https://doi.org/10.1128/AAC.05620-11>
- Poirel, L., Jayol, A., Bontron, S., Villegas, M.-V., Ozdamar, M., Turkoglu, S., & Nordmann, P. (2015). The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella*

- pneumoniae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(1), 75–80.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dku323>
- Poirel, L., Jayol, A., & Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>
- Poirel, L., Potron, A., & Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1597–1606.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dks121>
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 – Approximately Maximum-Likelihood Trees for Large Alignments. *PLoS ONE*, 5(3), e9490.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
- Qureshi, Z. A., Paterson, D. L., Potoski, B. A., Kilayko, M. C., Sandovsky, G., Sordillo, E., Polsky, B., Adams-Haduch, J. M., & Doi, Y. (2012). Treatment Outcome of Bacteremia Due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Superiority of Combination Antimicrobial Regimens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 2108–2113.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.06268-11>
- Rafiq, Z., Sam, N., & Vaidyanathan, R. (2016). Whole genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* U25, a hypermucoviscous, multidrug resistant, biofilm producing isolate from India. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(2), 144–146. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150423>
- Ramos, P. I. P., Picão, R. C., Vespero, E. C., Pelisson, M., Zuleta, L. F. G., Almeida, L. G. P., Gerber, A. L., Vasconcelos, A. T. R., Gales, A. C., & Nicolás, M. F. (2012). Pyrosequencing-based analysis reveals a novel capsular gene cluster in a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate identified in Brazil. *BMC Microbiology*, 12(1), 173.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-173>
- Ranieri, S. C., Fabbri, V., D'Amario, A. M., Frascella, M. G., Di Biase, V., Di Francesco, C., Di Sante, S., De Berardis, L., De Martinis, M., Partenza, M., Chiaverini, A., Centorotola, G., Cammà, C., Pomilio, F., & Cornacchia, A. (2024). First report of a bla<sub>NDM</sub>-producing extensively drug resistant *Klebsiella pneumoniae* ST437 in Italy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1426817>
- Rezaei, S., Tajbakhsh, S., Naeimi, B., & Yousefi, F. (2024). Investigation of gyrA and parC mutations and the prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiology*, 24(1), 265.  
<https://doi.org/10.1186/s12866-024-03383-5>
- Ribeiro, S. M., Cardoso, M. H., Cândido, E. de S., & Franco, O. L. (2016). Understanding, Preventing and Eradicating *Klebsiella Pneumoniae* Biofilms. *Future Microbiology*, 11(4), 527–538. <https://doi.org/10.2217/fmb.16.7>
- Robino, L., & Scavone, P. (2020). Nanotechnology in Biofilm Prevention. *Future Microbiology*, 15(6), 377–379. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0327>

- Rocha, J., Henriques, I., Gomila, M., & Manaia, C. M. (2022). Common and distinctive genomic features of *Klebsiella pneumoniae* thriving in the natural environment or in clinical settings. *Scientific Reports*, 12(1), 10441. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14547-6>
- Rodríguez-Baño, J., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Machuca, I., & Pascual, A. (2018). Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00079-17>
- Rodriguez-Martinez, J. M., Diaz de Alba, P., Biales, A., Machuca, J., Lossa, M., Fernandez-Cuenca, F., Rodriguez Bano, J., Martinez-Martinez, L., & Pascual, A. (2013). Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), 68–73. <https://doi.org/10.1093/jac/dks377>
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522–554. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>
- Russo, T. A., Olson, R., Fang, C.-T., Stoesser, N., Miller, M., MacDonald, U., Hutson, A., Barker, J. H., La Hoz, R. M., Johnson, J. R., Backer, M., Bajwa, R., Catanzaro, A. T., Crook, D., de Almeda, K., Fierer, J., Greenberg, D. E., Klevay, M., Patel, P., ... Zola, J. (2018). Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(9). <https://doi.org/10.1128/JCM.00776-18>
- Russo, T. A., Olson, R., MacDonald, U., Beanan, J., & Davidson, B. A. (2015). Aerobactin, but Not Yersiniabactin, Salmochelin, or Enterobactin, Enables the Growth/Survival of Hypervirulent (Hyper mucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* *Ex Vivo* and *In Vivo*. *Infection and Immunity*, 83(8), 3325–3333. <https://doi.org/10.1128/IAI.00430-15>
- Sabença, C., Costa, E., Sousa, S., Barros, L., Oliveira, A., Ramos, S., Igrejas, G., Torres, C., & Poeta, P. (2023). Evaluation of the Ability to Form Biofilms in KPC-Producing and ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Samples. *Antibiotics*, 12(7), 1143. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071143>
- Sabtcheva, S., Stoikov, I., Georgieva, S., Donchev, D., Hodzhev, Y., Dobрева, E., Christova, I., & Ivanov, I. N. (2024). Genomic Characterization of 16S rRNA Methyltransferase-Producing Enterobacterales Reveals the Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST6260 Harboring *rmtF*, *rmtB*, *bla*NDM-5, *bla*OXA-232 and *bla*SFO-1 Genes in a Cancer Hospital in Bulgaria. *Antibiotics*, 13(10), 950. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13100950>
- Sahoo, J., Sarkhel, S., Mukherjee, N., & Jaiswal, A. (2022). Nanomaterial-Based Antimicrobial Coating for Biomedical Implants: New Age Solution for Biofilm-Associated Infections. *ACS Omega*, 7(50), 45962–45980. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06211>
- Sahoo, S., Sahoo, R. K., Dixit, S., Behera, D. U., & Subudhi, E. (2023). NDM-5-carrying *Klebsiella pneumoniae* ST437 belonging to high-risk clonal complex (CC11) from an urban river in eastern India. *3 Biotech*, 13(5), 139. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03556-5>

- Sakamoto, N., Akeda, Y., Sugawara, Y., Takeuchi, D., Motooka, D., Yamamoto, N., Laolerd, W., Santanirand, P., & Hamada, S. (2018). Genomic Characterization of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* with Chromosomally Carried *bla*<sub>NDM-1</sub>. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(12). <https://doi.org/10.1128/AAC.01520-18>
- Satapoomin, N., Dulyayangkul, P., & Avison, M. B. (2022). *Klebsiella pneumoniae* Mutants Resistant to Ceftazidime-Avibactam Plus Aztreonam, Imipenem-Relebactam, Meropenem-Vaborbactam, and Cefepime-Taniborbactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(4). <https://doi.org/10.1128/aac.02179-21>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Schneiders, T., Amyes, S. G. B., & Levy, S. B. (2003). Role of AcrR and RamA in Fluoroquinolone Resistance in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Singapore. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2831–2837. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2831-2837.2003>
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Shafer, R. B., Levine, A. S., Marlette, J. M., & Morley, J. E. (1987). Effects of xylitol on gastric emptying and food intake. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 45(4), 744–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/45.4.744>
- Sharma, B., Shukla, S., Rattan, R., Fatima, M., Goel, M., Bhat, M., Dutta, S., Ranjan, R. K., & Sharma, M. (2022). Antimicrobial Agents Based on Metal Complexes: Present Situation and Future Prospects. *International Journal of Biomaterials*, 2022, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2022/6819080>
- Shon, A. S., Bajwa, R. P. S., & Russo, T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Virulence*, 4(2), 107–118. <https://doi.org/10.4161/viru.22718>
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210–3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
- Simner, P. J., Bergman, Y., Conzemius, R., Jacobs, E., Tekle, T., Beisken, S., & Tamma, P. D. (2023). An NDM-Producing *Escherichia coli* Clinical Isolate Exhibiting Resistance to Cefiderocol and the Combination of Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam: Another Step Toward Pan-β-Lactam Resistance. *Open Forum Infectious Diseases*, 10(7). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad276>
- Singh, A., Goering, R. V., Simjee, S., Foley, S. L., & Zervos, M. J. (2006). Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 512–530. <https://doi.org/10.1128/CMR.00025-05>
- Siqueira, F. dos S., Siqueira, J. D., Denardi, L. B., Moreira, K. S., Lima Burgo, T. A., de Lourenço Marques, L., Machado, A. K., Davidson, C. B., Chaves, O. A., Anraku de Campos, M. M., & Back, D. F. (2023). Antibacterial, antifungal, and anti-biofilm effects of sulfamethoxazole-complexes against pulmonary infection agents. *Microbial Pathogenesis*, 175, 105960. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105960>

- Şirin, M. C., Cezaroğlu, Y., Sesli Çetin, E., Arıdoğan, B., Trak, D., & Arslan, Y. (2023). Antibacterial and antibiofilm efficacy of colistin & meropenem conjugated silver nanoparticles against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Basic Microbiology*, 63(12), 1397–1411. <https://doi.org/10.1002/jobm.202300440>
- Sköld, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates*, 3(3), 155–160. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>
- Sophonsri, A., Kalu, M., & Wong-Beringer, A. (2024). Comparative In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam, Imipenem-Relebactam, and Meropenem-Vaborbactam against Carbapenem-Resistant Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, 13(5), 416. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13050416>
- Sosa, M., & Caunegre, M. F. (2018). Formulaciones de sulfadiazina de plata al 1% en el tratamiento de quemaduras. *SALUD MILITAR*, 37(1). <https://doi.org/10.35954/SM2018.37.1.7>
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Taha, R., Kader, O., Shawky, S., & Rezk, S. (2023). Ceftazidime-Avibactam plus aztreonam synergistic combination tested against carbapenem-resistant Enterobacterales characterized phenotypically and genotypically: a glimmer of hope. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 22(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s12941-023-00578-y>
- Takemoto, K., Nakayama, R., Fujimoto, K., Suzuki, Y., Takarabe, Y., Honsho, M., Kitahara, S., Noguchi, Y., Matsui, H., Hirose, T., Asami, Y., Hidaka, J., Sunazuka, T., & Hanaki, H. (2024). *In vitro* and *in vivo* activities of KSP-1007, a broad-spectrum inhibitor of serine- and metallo- $\beta$ -lactamases, in combination with meropenem against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1128/aac.01602-23>
- Tamma, P. D., Heil, E. L., Justo, J. A., Mathers, A. J., Satlin, M. J., & Bonomo, R. A. (2024). Infectious Diseases Society of America 2024 Guidance on the Treatment of Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Infections. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciae403>
- Tapiainen, T. (2002). *Microbiological Effects and clinical use of xylitol in preventing acute otitis media*.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233–2239. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>
- Uzairue, L. I., Rabaan, A. A., Adewumi, F. A., Okolie, O. J., Folorunso, J. B., Bakhrebah, M. A., Garout, M., Alfouzan, W. A., Halwani, M. A., Alamri, A. A., Halawani, S. A., Alshahrani, F. S., Hasan, A., Mutair, A. Al, Alhumaid, S., Etafo, J., Utip, I., Odoh, I. M., & Uwaezuoke, N. S. (2022). Global Prevalence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* from Bloodstream Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens*, 11(10), 1092. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101092>

- Valcek, A., Nesporova, K., Whiteway, C., De Pooter, T., De Coster, W., Strazisar, M., & Van der Henst, C. (2022). Genomic Analysis of a Strain Collection Containing Multidrug-, Extensively Drug-, Pandrug-, and Carbapenem-Resistant Modern Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(9).  
<https://doi.org/10.1128/aac.00892-22>
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 12(10), 1161–1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>
- Vaziri, S., Afsharian, M., Mansouri, F., Azizi, M., Nouri, F., Madadi-Goli, N., Mohseni Afshar, Z., Zamanian, M. H., Alvandi, A., & Ahmadi, K. (2020). Frequency of qnr and aac(6')Ib-cr Genes Among ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Burn Patients in Kermanshah, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 13(7).  
<https://doi.org/10.5812/jjm.100348>
- Vazquez, N. M., Moreno, S., & Galván, E. M. (2022). Exposure of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* biofilms to 1,8-cineole leads to bacterial cell death and biomass disruption. *Biofilm*, 4, 100085. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2022.100085>
- Villa, L., Feudi, C., Fortini, D., Brisse, S., Passet, V., Bonura, C., Endimiani, A., Mammina, C., Ocampo, A. M., Jimenez, J. N., Doumith, M., Woodford, N., Hopkins, K., & Carattoli, A. (2017). Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microbial Genomics*, 3(4).  
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000110>
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M., & Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 508–516.  
<https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1732231>
- Wang, X., Zhao, J., Ji, F., Chang, H., Qin, J., Zhang, C., Hu, G., Zhu, J., Yang, J., Jia, Z., Li, G., Qin, J., Wu, B., & Wang, C. (2021). Multiple-Replicon Resistance Plasmids of *Klebsiella* Mediate Extensive Dissemination of Antimicrobial Genes. *Frontiers in Microbiology*, 12.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.754931>
- Weng, X., Shi, Q., Wang, S., Shi, Y., Sun, D., & Yu, Y. (2020). The Characterization of OXA-232 Carbapenemase-Producing ST437 *Klebsiella pneumoniae* in China. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2020, 1–5.  
<https://doi.org/10.1155/2020/5626503>
- Wick, R. R., & Holt, K. E. (2022). Polypolish: Short-read polishing of long-read bacterial genome assemblies. *PLOS Computational Biology*, 18(1), e1009802.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009802>
- Wong, S. C. Y., Tse, H., Chen, J. H. K., Cheng, V. C. C., Ho, P.-L., & Yuen, K.-Y. (2016). Colistin-Resistant *Enterobacteriaceae* Carrying the *mcr-1* Gene among Patients in Hong Kong. *Emerging Infectious Diseases*, 22(9), 1667–1669.  
<https://doi.org/10.3201/eid2209.160091>
- World Health Organization. (2024). *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*.  
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

- Wu, W., Feng, Y., Tang, G., Qiao, F., McNally, A., & Zong, Z. (2019). NDM Metallo- $\beta$ -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00115-18>
- Wylie, K. M., Wylie, T. N., Minx, P. J., & Rosen, D. A. (2019). Whole-Genome Sequencing of *Klebsiella pneumoniae* Isolates to Track Strain Progression in a Single Patient With Recurrent Urinary Tract Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00014>
- Wyres, K. L., Gorrie, C., Edwards, D. J., Wertheim, H. F. L., Hsu, L. Y., Van Kinh, N., Zadoks, R., Baker, S., & Holt, K. E. (2015). Extensive Capsule Locus Variation and Large-Scale Genomic Recombination within the *Klebsiella pneumoniae* Clonal Group 258. *Genome Biology and Evolution*, 7(5), 1267–1279. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv062>
- Wyres, K. L., Hawkey, J., Hetland, M. A. K., Fostervold, A., Wick, R. R., Judd, L. M., Hamidian, M., Howden, B. P., Löhr, I. H., & Holt, K. E. (2019). Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(3), 577–581. <https://doi.org/10.1093/jac/dky492>
- Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2016). *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. *Trends in Microbiology*, 24(12), 944–956. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.007>
- Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 344–359. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>
- Yan, W., Xu, D., Shen, Y., Dong, F., & Ji, L. (2024). Molecular epidemiology of string test-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates in Huzhou, China, 2020–2023. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1411658>
- Yano, H., Shintani, M., Tomita, M., Suzuki, H., & Oshima, T. (2019). Reconsidering plasmid maintenance factors for computational plasmid design. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.12.001>
- Yu, W., Hallinen, K. M., & Wood, K. B. (2018). Interplay between Antibiotic Efficacy and Drug-Induced Lysis Underlies Enhanced Biofilm Formation at Subinhibitory Drug Concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01603-17>
- Zhu, J., Wang, G., & Li, M. (2024). Outbreak of NDM-5-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307: an emerging high-risk antimicrobial resistance clone in Shanghai, China. *MSystems*, 9(4). <https://doi.org/10.1128/msystems.01369-23>