Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Detección de genes de carbapenemasas en *Klebsiella* spp. procedentes de perros y gatos con cuadros clínicos

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

AUTOR

Emelin CRUZ CALIXTO

ASESOR

Mg. Sonia Yenny CALLE ESPINOZA

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cruz E. Detección de genes de carbapenemasas en *Klebsiella* spp. procedentes de perros y gatos con cuadros clínicos [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Emelin Cruz Calixto
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	76287759
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-2658-1184
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Sonia Yenny Calle Espinoza
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10321145
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4955-2378
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Lázaro de la Torre César Aquiles
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40628304
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Palomino Farfán Joel André
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	46238101

	Miembro del jurado 2
Nombres y apellidos	More Bayona Juan Anderson
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43316819
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.4.1.5. Microbiología y Parasitología Veterinaria
Grupo de investigación	Microbiología Aplicada a la Salud Pública, Animal y de Impacto Ambiental.
Agencia de financiamiento	Financiado por CONCYTEC, PROYECTOS DE Ciencias Básicas Nº413-2019
Ubicación geográfica de la investigación	Lugar: Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, sección Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Latitud: -12.080917 Longitud: -76.987626 Urbanización: (según corresponda) Manzana y lote: (según corresponda) Calle: (según corresponda) Latitud: -11.77453 Longitud: -76.98543
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020-2022
URL de disciplinas OCDE	Biología celular, Microbiología: https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01 Ciencia veterinaria: https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **miércoles 06 de diciembre de 2023**, a las **13: 00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral **N°0250-EPMV/FMV-2023**, integrado por los siguientes profesores:

MV. Dr.	**Lázaro de la Torre César Aquiles**	**Presidente del Jurado**
Blga. Mg.	**Calle Espinoza Sonia Yenny**	**Asesor de la Tesis**
MV. Mg.	**Palomino Farfán Joel André**	**Miembro del Jurado**
MV. PhD.	**More Bayona Juan Anderson**	**Miembro del Jurado**

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **EMELIN CRUZ CALIXTO,** para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

"DETECCIÓN DE GENES DE CARBAPENEMASAS EN *Klebsiella* spp. PROCEDENTES DE PERROS Y GATOS CON CUADROS CLÍNICOS"

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **diecisiete (17)**

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **14:30** horas, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Lázaro de la Torre César Aquiles MV. Dr.Prof. Asociado DE

UNMSM Firmado digitalmente por CALLE ESPINOZA DE CAMACHO Sonia Yenny FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 29.01.2024 12:20:48 -05:00

Calle Espinoza Sonia Yenny Blga. Mg. Prof. Principal DE

Palomino Farfán Joel André MV. Mg. Prof. Auxiliar TC

More Bayona Juan Anderson: MV. PhD Prof. Asociado DE

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Sonia Yenny Calle Espinoza, en mi condición de asesora acreditada con la Resolución Decanal N° Nº 0250-EPMV/FMV-2023 de la tesis/monografía/informe de investigación/trabajo académico, cuyo título es "Detección de genes de carbapenemasas en Klebsiella spp. procedentes de perros y gatos", presentado por el bachiller Emelin CRUZ CALIXTO, para optar el título de Médico Veterinaria. CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 8% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

UNMSM Firmado digitalmente por CALLE ESPINOZA DE CAMACHO Sonia Yenny FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 15.07.2024 14:19:56 -05:00

Firma del Asesor _____

DNI: 10321145

Nombres y apellidos del asesor: Sonia Yenny Calle Espinoza

DEDICATORIA v
AGRADECIMIENTOS vi
RESUMEN vii
ABSTRACT viii
LISTA DE CUADROS ix
LISTA DE FIGURAS x
LISTA DE ANEXOS xi
I. INTRODUCCIÓN 1
II. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 4
2.1. Género *Klebsiella* 4
2.1.1. Taxonomía e historia 4
2.1.3.1. Polisacáridos capsulares 8
2.1.3.2. Sideróforos 9
2.1.3.3. Factores de adherencia 10
2.1.3.4. Formación de biopelículas 10
2.1.4. Epidemiología 10
2.1.5. Métodos de identificación 11
2.1.5.1. Identificación fenotípica 11
2.1.5.2. Identificación molecular 14
2.2. Resistencia antimicrobiana 15
2.2.1. Definición 15
2.2.2. Mecanismos de resistencia 16
2.2.2.1. Modificación o inactivación por acción enzimática 16
2.2.2.2. Alteración del sitio de acción del antibiótico 17
2.2.2.3. Bombas de flujo 18
2.2.2.4. Impermeabilidad 18
2.2.3. Situación actual 19
2.3. Antimicrobianos 20
2.3.1. Definición 20

2.3.2. Generalidades 21
2.3.3. Antibiótico betalactámicos 21
2.3.3.1. Estructura y clasificación 21
2.3.3.2. Mecanismo de acción de los betalactámicos 26
2.4. Betalactamasas 27
2.4.1. Definición 27
2.4.2. Clasificación 28
2.4.3. Carbapenemasas 30
2.4.3.1. Clasificación 30
2.4.3.2. Riesgo para la salud pública la transmisión de genes de resistencia de animales de compañía 33
2.5. Impacto de *Klebsiella* productoras de carbapenemasas en animales de compañía 34
III. MATERIALES Y MÉTODOS 36
3.1. Diseño de estudio 36
3.2. Lugar de ejecución y periodo de duración 36
3.3. Descripción del material experimental 36
3.4. Materiales y equipos ..... **¡Error! Marcador no definido.**
3.4.1. Material biológico ..... **¡Error! Marcador no definido.**
3.4.2. Materiales 38
3.4.3. Equipos de laboratorio 38
3.4.4. Reactivos 39
3.5. Metodología 39
3.5.1. Reactivación de aislados 39
3.5.2. Extracción de ADN 40
3.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa 41
3.5.4. Electroforesis en gel de agarosa 42
IV. RESULTADOS 43
V. DISCUSIÓN 46
VI. CONCLUSIONES 52

VII. RECOMENDACIONES 53
VIII. LITERATURA CITADA 54
IX. ANEXOS 72

DEDICATORIA

A Dios por permitirme dar este siguiente paso en mi vida y estar acompañada de las personas que más amo y han estado conmigo siempre que lo he necesitado.

A mis padres por ser mi motor principal para superarme día a día y lograr poco a poco mis sueños, por apoyarme y motivarme en cada etapa de mi vida, y por permitirme ser la persona que soy actualmente. Gracias por sacrificarse y ser un orgullo para mí, porque desde pequeña he podido ver el gran esfuerzo que han realizado por mí y mis hermanas para que podamos cumplir cada anhelo, todo esto es gracias a ustedes.

A cada una de mis hermanas que han estado pendiente de mi crecimiento profesional y emocional. Muchas gracias Vanessa por ser esa hermana mayor que todos quisiéramos tener, porque cada palabra tuya siempre ha sido por mi bienestar y crecimiento profesional.

Muchas gracias Lin y Lily por ser mis hermanas, por apoyarme cuando más lo necesité y siempre alentarme a no rendirme.

Gracias Chris por motivarme y estar conmigo en uno de los momentos más difíciles para mí y no soltar mi mano, por confiar en mis capacidades y siempre alentarme cuando creía ya no poder.

Gracias Cami por ser mi mejor amiga y estar para mí siempre, por cada palabra de aliento, por escucharme cada vez que lo he necesitado y por confiar en mí.

Gracias a Luz y Sharon por ser grandes amigas para mí y aconsejarme siempre de la mejor manera, las aprecio mucho.

Gracias a cada mascotita que he tenido a lo largo de mi vida, porque fueron ellos los que me motivaron ser Médico Veterinario, buscando un mejor trato y más justo para ustedes. Gracias Mishi por llegar a mi vida y ser mi gran compañera.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis la doctora Sonia Calle por su gran apoyo durante la realización de esta tesis, brindándome su asesoría, apoyo y tiempo para cada consulta que tuve.

Al Dr. Juan Siuce por su asesoría continua desde el inicio de esta tesis, absolviendo mis dudas en todo momento para que este proyecto salga lo mejor posible, por su paciencia y buen humor siempre que tenía alguna consulta.

Al Dr. Joel Palomino por su orientación, guía y apoyo durante la realización de este estudio, aconsejándome en todo momento y compartiendo siempre sus conocimientos de la mejor manera.

A Luis por su apoyo constante durante mi estadía en el Laboratorio de Bacteriología para llevar a cabo cada procedimiento de mi tesis y resolver mis dudas.

Al Dr. André por sus consejos durante el desarrollo de mi tesis y por su amistad a lo largo de los años.

A Huayllani por su apoyo durante la elaboración de la tesis y su amistad durante todo el proyecto.

A la familia Invetsa por la paciencia, apoyo y consideración durante todo este proceso, ya que ha sido todo un reto hacer ambas cosas pero todo esfuerzo siempre conlleva a cosas buenas.

RESUMEN

La resistencia antimicrobiana es uno de los más graves problemas que se propagan con gran rapidez a nivel mundial, trayendo como consecuencia, la pérdida de efectividad de protocolos terapéuticos como tratamiento a diversas enfermedades. Como mecanismo principal de la resistencia antimicrobiana, se encuentra la producción de enzimas y entre ellas encontramos a las carbapenemasas. Las carbapenemasas son enzimas que inhiben la acción de los antibióticos carbapenémicos, los cuales son considerados como última alternativa terapéutica.
A lo largo de los últimos años, una de las bacterias que están reportándose con alta frecuencia es *Klebsiella* spp., aisladas inicialmente en humanos, pero reportes finales han visto su presencia también en animales, entre ellos los perros y gatos. Es por ello, que el presente estudio buscó detectar la presencia de genes de carbapenemasas en 41 aislados de *Klebsiella* spp., provenientes de perros y gatos, procedentes del cepario del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) durante el periodo 2018-2022. Como primer paso, se realizó la reactivación de las cepas bacterianas criopreservadas y se continuó con la extracción del ADN, con la finalidad de evaluar la detección de genes de carbapenemasas como bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP-1} y bla_{IMP-2} mediante PCR. Como resultados se obtuvo un 9.8% del gen bla_{OXA-48}, 2.4% gen bla_{KPC} y bla_{NDM} y 0% bla_{IMP-1} y bla_{IMP-2}. Estos resultados evidencian la presencia de genes de carbapenemasa en animales de compañía como los perros y gatos, por lo que representa un gran riesgo para la salud pública.

Palabras claves: *Klebsiella* spp., resistencia antimicrobiana, perros, gatos, salud pública.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is one of the most serious problems that spread very quickly worldwide, resulting in the loss of effectiveness of therapeutic protocols as a treatment for various diseases. The main mechanism of antimicrobial resistance is the production of enzymes and among them we find carbapenemases. Carbapenemases are enzymes that inhibit the action of carbapenem antibiotics, which are considered the last therapeutic alternative. Over the last few years, one of the bacteria that is being reported with high frequency is *Klebsiella* spp., initially isolated in humans, but final reports have also seen its presence in animals, including dogs and cats. For this reason, the present study sought to detect the presence of carbapenemase genes in 41 isolates of *Klebsiella* spp., from dogs and cats, from the strain collection of the Veterinary Microbiology and Parasitology Laboratory, Bacteriology and Mycology Section of the Faculty of Veterinary Medicine at the Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) during the period 2018-2022. As a first step, the reactivation of the cryopreserved bacterial strains was carried out and the DNA extraction continued, in order to evaluate the detection of carbapenemase genes such as bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP-1} and bla_{IMP-2}. PCR. As results, 9.8% of the bla_{OXA-48} gene, 2.4% of the bla_{KPC} and bla_{NDM} genes and 0% of bla_{IMP-1} and bla_{IMP-2} were obtained. These results show the presence of carbapenemase genes in companion animals such as dogs and cats, which is why they represent a great risk to public health.

Key words: *Klebsiella* spp. antimicrobial resistance, dogs, cats, public health.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para diferenciar la especie *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*……**pág. 12**

Cuadro 2. Secuencia de cebadores para diferenciar el género *Klebsiella* y especies……**pág. 13**

Cuadro 3. Clasificación de las penicilinas ……**pág. 20**

Cuadro 4. Clasificación de las cefalosporinas ……..**pág. 21**

Cuadro 5. Clasificación de los carbapenémicos ……**pág. 22**

Cuadro 6. Clasificación de las enzimas betalactamasas ……**pág. 26**

Cuadro 7. Secuencia de cebadores para los genes de carbapenemasas ……..…**pág. 37**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica del género *Klebsiella* ……..**pág. 5**

Figura 2. Fenotipo de hipermucosidad en *Klebsiella* spp. ……..**pág. 7**

Figura 3. Colonias mucoides de *Klebsiella* spp. en agar Mc Conkey ……**pág. 10**

Figura 4. Mecanismos de resistencia antimicrobiana……. **pág. 17**

Figura 5. Principales causales de decesos en el año 2050 ……..**pág. 18**

Figura 6. Mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos ……...**pág. 24**

Figura 7. Clasificación de las Carbapenemasas ……..**pág. 29**

Figura 8. Distribución mundial de enterobacterias con genes de carbapenemasas en animales de compañía y vida silvestre…….. **pág. 31**

Figura 9. Crecimiento de colonias de *Klebsiella* spp. en agar Mc Conkey……..… **pág. 35**

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa para el gen bla_{KPC}……...……. **pág. 38**

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa para el gen bla_{NDM} ……**pág. 39**

Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa para el gen bla_{OXA-48} …….**pág. 39**

Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa para el gen bla_{IMP-1} y bla_{IMP-2} ……..…..…...**pág. 40**

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Reactivación y extracción de ADN …… **pág. 64**

Anexo 2. Presencia de genes de carbapenemasas en las cepas de *Klebsiella* spp……...**pág. 67**

Anexo 3. Cuadros clínicos por *Klebsiella* sp. en perros y gatos ……**pág. 69**

Anexo 4. Clasificación de enfermedades por especie……..**pág. 70**

Anexo 5. Pruebas de inmunocromatografía para detección de carbapenemasas…….**pág 90**

I. INTRODUCCIÓN

Las especies que conforman el género *Klebsiella*, el cual pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacterias gramnegativas en forma de bacilos que pueden encontrarse en aguas residuales, agua dulce o superficies mucosas de diversos mamíferos. La especie más importante del género es *Klebsiella pneumoniae* y junto a otra especie como *Klebsiella oxytoca* son los agentes responsables de las infecciones nosocomiales (Podschun y Ullmann, 1998). Esta bacteria ha sido hallada como parte de la microbiota intestinal de aves, peces o mamíferos. Se encuentra muy adaptada a ambientes con alta presión antibiótica como los centros hospitalarios, logrando colonizar a pacientes y apareciendo como un patógeno oportunista (Piperaki *et al*., 2017).

La resistencia antimicrobiana es uno de los principales problemas en todo el mundo. En los últimos diez años, la aparición de resistencia antimicrobiana de cefalosporinas y fluoroquinolonas en *Klebsiella* spp. es motivo de gran preocupación y ya no exclusivamente en medicina humana, sino también en medicina veterinaria por la aparición de cepas resistentes en animales de compañía, de producción, entre otros (Meletis, 2016).

El aumento de casos asociados a la resistencia antimicrobiana de grupos bacterianos es uno de los principales problemas por la poca opción de antimicrobianos que quedan disponibles para otorgar una correcta terapia antimicrobiana. En los años 80s se reportó por primera vez aislados de *Klebsiella* spp. productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y posteriormente con la detección de bacterias productoras de carbapenemasas, haciendo más crítico los cuadros de resistencia (López y Echeverri, 2010).

Dentro de los antibióticos betalactámicos se encuentran los carbapenémicos, los cuales se caracterizan por presentar un amplio espectro antimicrobiano. Debido a la aparición de enzimas como las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), los antibióticos usados como última alternativa terapéutica en pacientes con infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE, fueron los carbapenémicos (Meletis, 2016). Si bien los carbapenémicos no suelen ser hidrolizados por las betalactamasas, la aparición de nuevas enzimas con capacidad de hidrolizar a los carbapenémicos evidenció una gran problemática (Bueno, 2015).

Los antibióticos carbapenémicos presentan un mayor espectro frente a las betalactamasas, teniendo actividad sobre bacterias grampositivas y gramnegativas, siendo esta actividad fundamental para el tratamiento de una bacteria multirresistente. Su mecanismo de acción al igual que los otros integrantes de los betalactámicos es inhibiendo la última fase de la síntesis de la pared bacteriana por su alta afinidad con enzimas que actúan en la formación y ensamblaje del peptidoglicano (Moreno, 2013).

Una nueva preocupación ha aparecido con respecto a la transmisión de bacterias con carácter patógeno desde animales de compañía a humanos, ya que el estrecho contacto que existe entre los mismos, aumenta considerablemente la posibilidad de transmitir bacterias entre especies, en algunos casos a través de contaminación oro fecal. Estudios previos han descrito el intercambio de cepas de *E. coli* entre especies que presentan un estrecho contacto como los humanos y perros (Naziri *et al*., 2016), y se estima que la misma transmisión exista para cepas de *K. pneumoniae*, ya que se ha observado el papel de los animales como reservorio de cepas descritas anteriormente en infecciones de humanos (Marques *et al*., 2019).

Con la aparición de bacterias productoras de carbapenemasas en medicina veterinaria, el problema que ejerce la difusión de diversos microorganismos en distintas áreas lo hace aún más preocupante, ya que anteriormente se creía que ese tipo de bacterias eran exclusivas en humanos, además que la ubicación de estas enzimas están codificadas en elementos genéticos móviles fáciles de trasmitir, lo que lo hace más riesgoso (González *et al*., 2016).

En la actualidad, existe poca información acerca de las bacterias del género *Klebsiella* productoras de carbapenemasas, además, existen diversos estudios que indican la potencial transmisión de genes de carbapenemasas en cepas de *Klebsiella* spp., es por ello, que el presente estudio tiene como finalidad detectar la presencia de genes de carbapenemasas en *Klebsiella* spp. procedentes de perros y gatos durante el periodo 2018-2022 del cepario del Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Sección Bacteriología de la Facultad de Medicina

Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), e incentivar a las entidades de salud que realicen un monitoreo exhaustivo para conocer el estado real sobre la diseminación de estas bacterias y se tenga una mayor concientización acerca del uso racional de antimicrobianos en todo el mundo.

II. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2.1. Género *Klebsiella*

2.1.1. Taxonomía e historia

El género *Klebsiella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella pneumoniae* fue la primera especie del género descrita por primera vez en el año 1882 por el microbiólogo y patólogo; Carl Friedlander, quien aisló un bacilo de los pulmones de pacientes fallecidos por cuadros de neumonía (Brisse *et al*., 2006; Ashurst y Dawson, 2022). Además, evidenció la ausencia de las mismas bacterias en aquellos pacientes que tuvieron una causa distinta de muerte, logrando correlacionar, que la presencia de las mismas son las causantes de los fallecimientos por cuadros neumónicos. Inicialmente esta bacteria recibió el nombre de bacilo de Friedlander, pero en el año 1886; con los avances existentes en la técnica de tinción Gram, Trevisan le asigna el nombre de *Klebsiella* en honor al microbiólogo alemán Edwin Klebs y se incluye este género dentro de las bacterias gramnegativas (Shon *et al*., 2013).

La primera clasificación del género *Klebsiella* se basó en los distintos cuadros clínicos que presentaron los pacientes, ocasionando que en 1887 se divida en solo dos especies: *K. rhinoscleromatis* y *K. pneumoniae*. En 1893 se aisló una bacteria proveniente de secreciones nasales de pacientes con ozena (enfermedad que ocasiona cambios morfológicos en las estructuras nasales), por lo que se incluye a *K. ozenae* dentro del género (Bergey *et al*., 1925). A mediados de 1886, se halló un bacilo a partir de muestras de leche que recibió el nombre de *Bacillus oxytocus perniciosus* el cual cambió a *Aerobacter oxytocum* en 1923 y logra ser renombrado como *Klebsiella oxytoca* en 1956. Dado que el género *Klebsiella* solía ser indol negativo y esta nueva

K. oxytoca era positivo, se cuestionó durante mucho tiempo su existencia dentro del grupo, por consiguiente, decidieron reclasificarla como una subespecie de *K. pneumoniae* (Edwards y Ewing, 1972; Ørskov, 1974). Con el uso de pruebas de ADN se demostraron claras diferencias entre *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, ocasionando que esta última ahora sea una especie propiamente dicha (Brenner *et al*., 1977).

Años después, proveniente de ambientes botánicos, medios acuáticos y suelos, se aisló a *K. planticola* y *K. terrigena* como otras dos especies adicionales (Jain *et al*., 1974; Woodward *et al*., 1979).

Se utilizaron pruebas de parentesco de ADN para esclarecer muchas interrogantes, pero a pesar de ello, no era posible separar completamente a *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis* de *K. pneumoniae*, por lo que se decide que las dos primeras especies mencionadas, sean consideradas subespecies de *K. pneumoniae* y esto se publica en la primera edición del Manual Sistemático de Bergey's (Ørskov y Ørskov, 1977).

Un nuevo problema ocurrió en 1885 cuando Escherich trató de distinguir a *K. pneumoniae* de *Bacterium lactis aerogenes* debido a que ambos fermentaban gran número de carbohidratos, además, este último cambia de nombre a *Aerobacter aerogenes*. Con la aparición del test de descarboxilasa, se logra diferenciar a *K. pneumoniae* de *A. aerogenes* y finalmente *A. aerogenes* pasa a formar parte del género *Enterobacter* con el nombre de *Enterobacter aerogenes* (Hormaeche y Edwards, 1958; Hormaeche y Edwards, 1960). Cuando se evaluó genéticamente al *E. aerogenes*, se evidenció que tenía muchas más semejanzas al género *Klebsiella* que al propio *Enterobacter*, es así que se modifica nuevamente su clasificación y actualmente recibe el nombre de *K. aerogenes* (Wesevich *et al*., 2020).

Conforme han pasado los años, la clasificación ha ido cambiando gracias al aporte de técnicas moleculares y según las últimas publicaciones, el género Klebsiella se divide en *K. oxytoca*, *K. aerogenes*, *K. terrigena*, *K. michiganensis*, *K. pasteurii*, *K. grimontii*, *K. huaxiensis* y el complejo de especies de *K. pneumoniae* (KpsC), el cual incluye a *Klebsiella pneumoniae* (Kp1), *Klebsiella quasineumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp4), *Klebsiella quasineumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2), *Klebsiella quasivariicola* (Kp6), *Klebsiella africana*, *Klebsiella variicola* subsp. *tropica* (Kp5) y *Klebsiella variicola* subsp.*variicola* (Kp3) (Wyres *et al*., 2020). Si anteriormente se consideraba como especies a *K. terrigena, K. planticola* o *K. trevisanii* y *K. ornithinolytica*, actualmente estas especies se han clasificado como parte del género *Raoultella* (Drancourt *et al.*, 2001) (**Figura 1**).

- Dominio: Bacteria
- Filo: Proteobacteria

- Clase: Gammaproteobacteria
- Orden: Enterobacteriales
- Familia: *Enterobacteriaceae*
- Género: *Klebsiella*
- Especies:

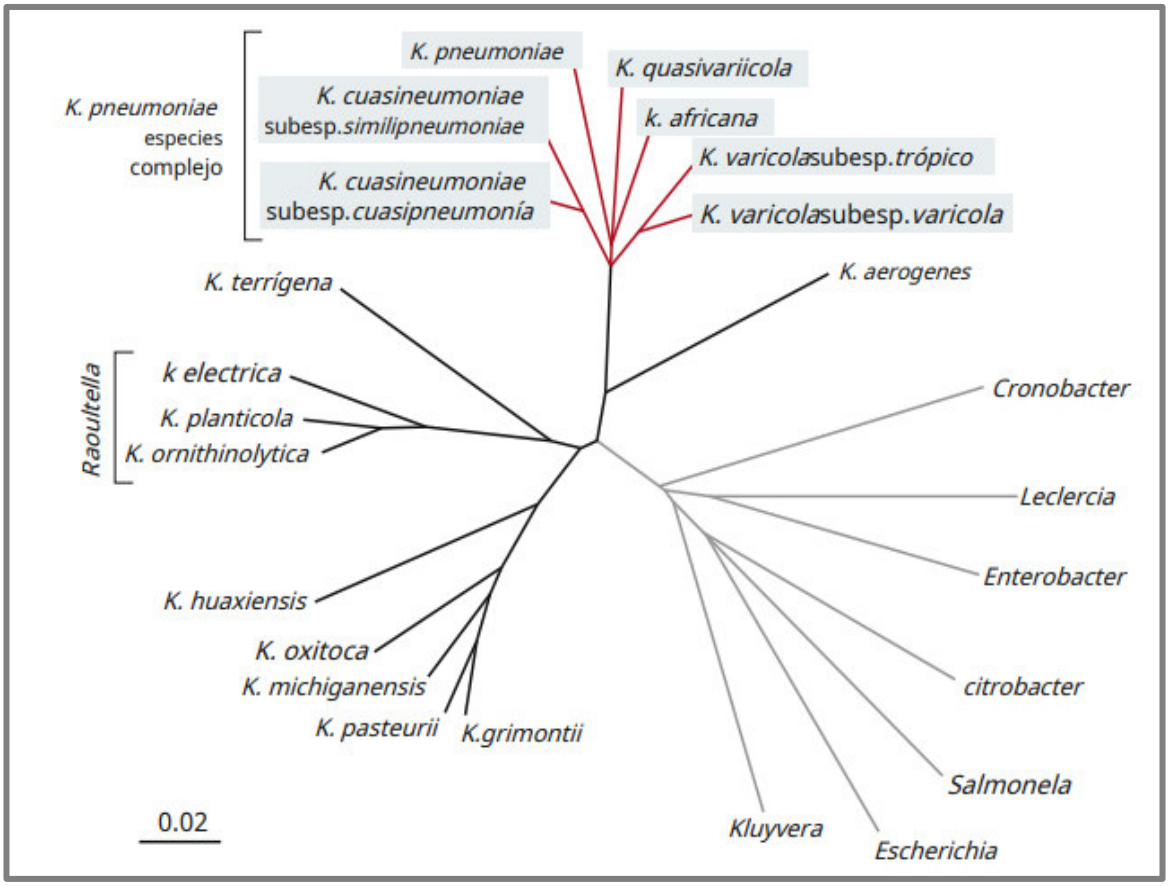


Figura 1: Clasificación taxonómica del género *Klebsiella* (Wyres *et al*., 2020).

2.1.2. Características biológicas

El género *Klebsiella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está compuesto por bacterias gramnegativas, por lo que posee una membrana externa con lipopolisacáridos (LPS) y una la pared celular. Presenta una forma bacilar, de 0.3-1.0 µm de diámetro y 0.6-0.0 µm de longitud, es anaerobia facultativa debido a que crecen con o sin la presencia de oxígeno, inmóvil, usualmente posee una cápsula compuesta por polisacáridos que le otorga un aspecto brillante y mucoide a las colonias visualizadas en placas de agar Mc Conkey, además de ser un factor de virulencia

fundamental que permite la evasión de la respuesta inmunológica del hospedero y determina el grado de patogenicidad (Brisse *et al*., 2006).

Se han encontrado cepas muy patógenas que han desarrollado una característica fenotípica de hipermucoviscosidad por la posible acción de dos genes asociados: *magA* y *rmpA*, además de realizar una hiperproducción de polisacáridos que genera colonias pegajosas (Carrillo *et al*., 2013) (**Figura 2**). La evidencia de dicha característica se realiza a través de la formación de hilos mucoides (mayores a 5mm) al momento de extender con un ansa las colonias ubicadas en las placas de agar. Esta prueba también recibe el nombre de "string test" (Yu *et al*., 2006).

Las cepas hipermucosas se asocian a que presentan un mayor grado de patogenicidad por su elevada resistencia a procesos como lisis celular, fagocitosis o desencadenamiento de la respuesta inmunológica (Kuo *et al*., 2010).

K. pneumoniae es la especie de mayor importancia y junto a *K. oxytoca* son consideradas como las principales causales de infecciones nosocomiales en humanos (pacientes que se encuentran hospitalizados y su sistema inmune está comprometido), además de ser la segunda especie más común del género; después de *Escherichia coli*, que causa infecciones urinarias (Podschun y Ullmann, 1998; Marqués *et al*., 2018).

Klebsiella spp. se puede encontrar en las superficies mucosas de perros, gatos y otros mamíferos, entre ellos, los humanos (Nordmann *et al*., 2009). En animales, la especie *K. pneumoniae* suele causar infecciones en las vías respiratorias altas, cuadros de septicemia, piometras, osteomielitis, mastitis, entre otras patologías (Adler *et al*., 2007; Ling *et al*., 2001; Roberts *et al*, 2000). Otra fuente donde se ha logrado hallar a este género es en ambientes acuáticos, suelos, vegetación, inclusive en alimentos como la industria láctea que ha conllevado a generar grandes pérdidas económicas (Paulin *et al*., 2008).

Para el crecimiento del género *Klebsiella* no es necesario el uso de medios de cultivo complejos, por ello pueden desarrollarse en agar sangre, Mc Conkey, chocolate, entre otros y su crecimiento óptimo se da a los 37°C con un pH de 7. Su aislamiento puede hacerse a través de muestras urinarias, sanguíneas, hisopados nasales, abscesos, entre otros (Cubero, 2015).

En medicina veterinaria aún es poco común la investigación acerca de la prevalencia o perfil de resistencia antimicrobiana que presenta *Klebsiella* spp., además del riesgo que genera contraer una infección por el contacto directo entre animales - humanos, y el consumo de alimentos contaminados por esta bacteria (Wareth y Neubauer, 2021).

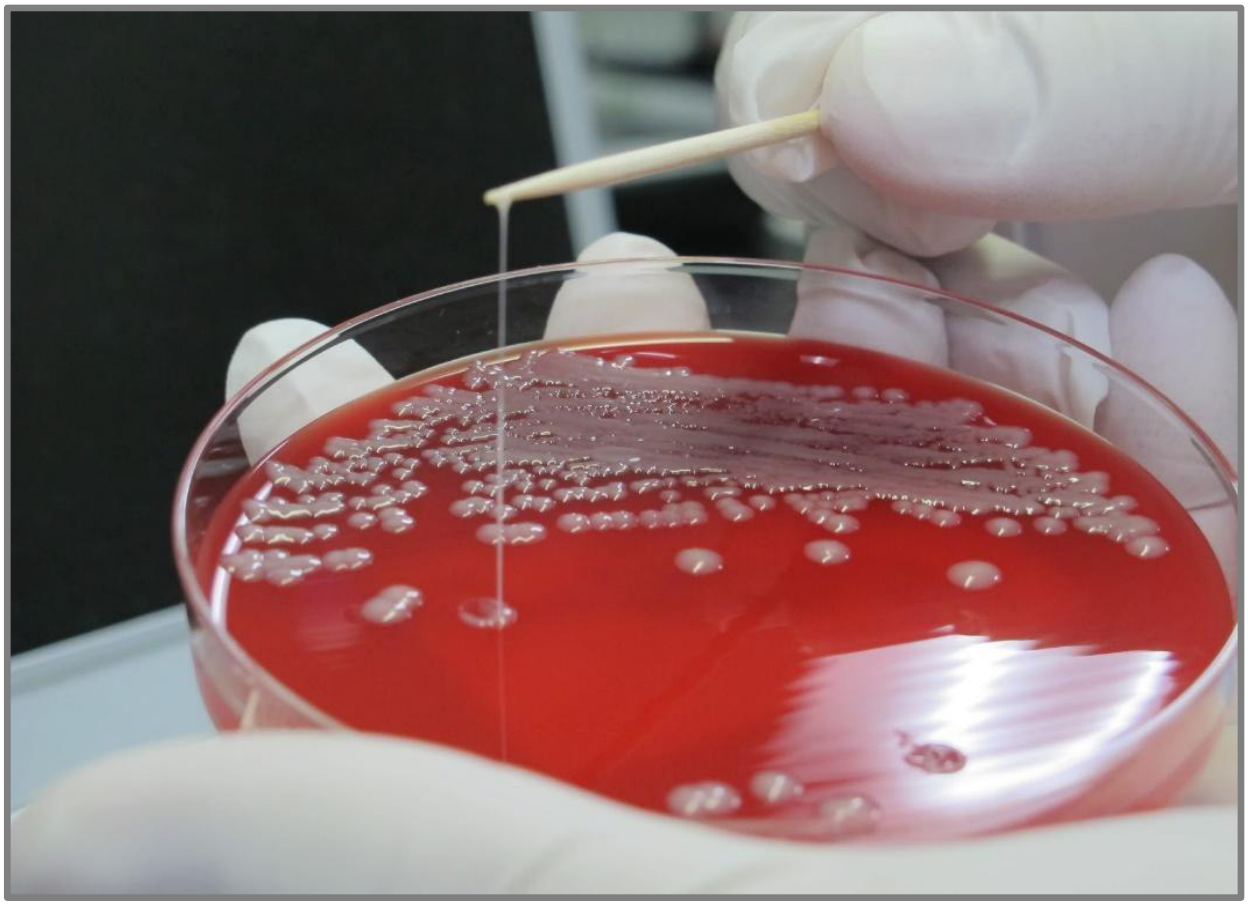


Figura 2: Fenotipo de hipermucosidad en *Klebsiella* spp. (Maeda, 2017)

2.1.3. Factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae*

A pesar de la gran importancia clínica que presenta *Klebsiella pneumoniae*, muchos de sus factores de virulencia aún no están completamente esclarecidos y varios de esos factores son los que le dan la capacidad de evadir la respuesta del sistema inmunitario e invadir diferentes tejidos (Bueno, 2015).

2.1.3.1. Polisacáridos capsulares

Las cepas de *Klebsiella* se clasifican en más de 77 serotipos capsulares, los cuales determinan el grado de virulencia. Estudios realizados en ratones de laboratorio, evidenciaron que los serotipos más patógenos son los antígenos K1 y K2 y los menos patógenos K7 y K21, lo cual se evalúo por el nivel de respuesta inmunológica que generó en el hospedero (Podschun y Ullmann, 1992; Ashurst y Dawson, 2022). El antígeno que se ubica en el lipopolisacárido (LPS) es el S y

se han descrito 9 variedades (Tártara, 2017). Los antígenos K cumplen un rol muy importante en su protección, ya que evitan la opsonofagocitosis y, por lo tanto, no podrán ser reconocidas por las células de defensa (Brisse *et al*., 2006).

El antígeno presente en la cápsula del género *Klebsiella* actúa como una barrera hidrofílica, dándole una apariencia mucoide y brillosa cuando crecen en medios como agar Mc Conckey (Tártara, 2017).

2.1.3.2. Sideróforos

La presencia del hierro para el crecimiento, desarrollo y replicación de las bacterias es indispensable, aunque su disponibilidad es limitada por la competencia con el organismo del hospedero, el cual realiza una captación intracelular a través de la hemoglobina, hemosiderina, entre otros (Shon *et al*., 2013).

Los sideróforos son moléculas proteicas producidas por las bacterias, se caracterizan por presentar una alta afinidad por el hierro y facilitan la obtención del mismo a partir de su unión con las proteínas del hospedero (Brisse *et al*., 2006). Los sideróforos producidos por *K. pneumoniae* presentan una mayor capacidad para la captación del hierro en comparación a las proteínas propias del hospedero y evitan que el sistema inmunológico los neutralice. Además, estudios realizados han evidenciado que la acción de los sideróforos no es exclusiva para la obtención del hierro, ya que también participa en la activación del factor inducido por la hipoxia-1α (HIF-1α), favoreciendo la expresión de los genes que intervienen en cuadros inflamatorios y diseminación bacteriana gracias al cuadro de estrés celular que genera (Holden *et al*., 2016).

Dentro de los sideróforos que produce *K. pneumoniae*, podemos encontrar a la aerobactina (iucA), enterobactina (ent), yersiniabactina (ybtS), entre otros. La lipocalina 2 (Lcn2) es una proteína propia del sistema inmune innato que permite la captación del hierro por parte de las células del hospedador, evitando así el secuestro por parte de los sideróforos bacterianos (Holden *et al*., 2016). La producción por parte de *K. pneumoniae* de sideróforos resistentes a Lcn2 genera que esta proteína se una específicamente con una enterobactina, impidiendo la captación del hierro para el hospedero, por ello, la producción de sideróforos con esta capacidad son los que desencadenan enfermedades (Bachman *et al*., 2011).

2.1.3.3. Factores de adherencia

Las fimbrias son pequeñas proyecciones que se extienden desde la superficie de la bacteria, y permiten la adhesión del microorganismo a la célula del hospedero. Dentro del género *Klebsiella* se encuentran las hemaglutininas que son glicoproteínas ubicadas en las fimbrias de la bacteria y que llevan a cabo el proceso de hemaglutinación. *K. pneumoniae* posee dos tipos de adherencias, las fimbrias tipo 1 y 3 (Podschun y Sahly, 1991). Las fimbrias de tipo 1 o también llamadas gruesas, median la hemaglutinación gracias a su unión con células hospederas que contienen manosa, llegando a estar presente en un 80% de las cepas de *K. pneumoniae* y actúan en la colonización del tracto urinario, mientras que las fimbrias de tipo 3 o delgadas están formadas por la proteína MrkA y permiten su adhesión a las células del sistema respiratorio, urinario y endoteliales y son aquellas que permiten la formación de biopelículas y otorgan una mayor capacidad de resistencia (Jagnow y Clegg, 2003; Struve *et al*., 2009).

2.1.3.4. Formación de biopelículas

Diversos microorganismos sobreviven como individuo o población debido a su capacidad de formar biopelículas. Las biopelículas son aglomeraciones de microorganismos que están circundados por una matriz extracelular, compuesta por lípidos, proteínas, ADN, entre otros y que le dan la capacidad de adherirse a superficies bióticas y abióticas, además, de protegerlos de la acción de los antibióticos, disminuir la acción de los mismos o favorece su sobrevivencia en medios hostiles. (Donlan, 2002; Cubero, 2015). Las infecciones iniciales suelen responder favorablemente a los tratamientos a base de antibióticos, a diferencia de las infecciones causadas por bacterias como *K. pneumoniae* que producen dichas biopelículas, las cuales evidencian una mayor resistencia a los antibióticos o suelen presentarse de forma recurrente (Donlan y Costerton, 2002).

2.1.4. Epidemiología

Klebsiella pneumoniae suele causar un gran número de infecciones que día a día son más complejas de tratar. Existen dos tipos de cepas de *K. pneumoniae*, las cepas clásicas (cKp) y las hipervirulentas (hvKp). Las cKp no suelen ser virulentas, pero que son productoras de genes de resistencia a distintas familias de antibióticos y se asocian a infecciones nosocomiales,

infecciones en el sistema urinario o neumonía en pacientes previamente inmunocomprometidos (Podschun y Ullmann, 1998). Durante los últimos 20 años, las cKp han ido adquiriendo mayor importancia debido al incremento de resistencia antimicrobiana. Las cepas hipervirulentas fueron detectadas por primera vez en el continente asiático causando cuadros de meningitis, abscesos, infecciones en el sistema nervioso central, entre otros, a pacientes sin ninguna afección previa y suelen ser sensibles a los antimicrobianos (Liu *et al*., 1986).

2.1.5. Métodos de identificación

2.1.5.1. Identificación fenotípica

A) Medios de cultivo

Se puede realizar una siembra en un agar general como el agar sangre o en uno más selectivo como el agar Mc Conkey, el cual posee concentraciones de sales biliares y logra inhibir a microorganismos grampositivos, aunque no es considerado selectivo completamente porque la



cantidad de sales biliares es ligeramente baja en comparación a otros agares selectivos. Incubar las placas previamente sembradas a una temperatura de 35-37°C durante 24 horas. Las colonias compatibles con el género *Klebsiella* son rosadas, de apariencia mucoide (**Figura 3**) y fermentadores de lactosa (Koneman, 2008).

Figura 3: Colonias mucoides de *Klebsiella* spp. en agar Mc Conkey (Rey, 2019)

B) Tinción Gram

Procedimiento muy utilizado para la detección de agentes bacterianos. Permite identificar ciertas estructuras de grupos bacterianos, con la finalidad de diferenciar agentes gran positivos de los gramnegativos. Para realizar este procedimiento, debemos tomar colonias frescas (de un crecimiento no mayor a 18-24 horas a 37°C) de un agar, puras e individuales, colocarlas en una lámina portaobjetos y fijarlas mediante calor para evitar su desprendimiento (Rodríguez y Arenas, 2018).

Como primer paso se deben de teñir las células con cristal violeta (tinte básico), logrando que todas las células bacterianas presentes sean teñidas de color azul. Para el segundo paso, debemos agregar una solución de yoduro de yodo y potasio, la cual logra ingresar al interior de las células y forma un complejo insoluble en conjunto con el cristal violeta. El tercer paso consiste en agregar alcohol-acetona, por lo que logra romper el complejo formado por el cristal violeta-yodo, permitiendo que las células grampositivas sean las únicas que permanezcan teñidas de color azul. Posterior a ello, se puede agregar una solución como contratinción, como la safranina, ya que logra que las células decoloradas por el alcohol-acetona sean visibles al adoptar el color fucsia. La lectura de los resultados es a través de la visualización de la lámina al microscopio, usando un objetivo de 100x (Sandle, 2004).

C) Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas se caracterizan por ser rápidas y sencillas, además, se ejercen sobre colonias aisladas, permitiendo su rápida diferenciación. Estas pruebas se fundamentan en las características metabólicas de cada grupo bacteriano ya que su identificación se basa en la detección de actividad enzimática (Fernández *et al*., 2010).

En el (**Cuadro 1**) se evidencian las características bioquímicas de ambas especies, lo que nos permitirá diferenciarlas.

- Indol: Producto de la presencia de la enzima triptofanasa, se da la degradación del triptófano (aminoácido) y se obtiene como producto al indol. Para realizar esta prueba se debe incubar el microorganismo en el medio de cultivo con peptona por 24-48 horas y posterior a ello, agregar entre 4 a 5 gotas del reactivo de Kovacs. Cuando la bacteria presenta la enzima triptofanasa, se logrará observar un anillo en la parte superior de color rojo y considerará que es una muestra positiva, caso contrario será negativa. En el caso de la especie *Klebsiella oxytoca*, se considera una muestra indol positiva (Fernández *et al*., 2010).

- Urea: Debido a la enzima ureasa, se da la hidrolización de la urea y se logra formar como producto el amoníaco y dióxido de carbono. Los microorganismos que cuenten con la capacidad de producir la enzima generando la degradación, hará que el amoniaco haga cambiar el color del indicador amarillo pasando a un rojo púrpura por acción el indicador de pH rojo de fenol (MDM, 2021 y Fernández *et al*., 2010).

- Rojo de metilo: Es utilizado para detectar la acidez (fermentación ácido-mixta) de un organismo que logra fermentar la glucosa, siendo las bacterias que fermentan glucosa las que producen ácido orgánico. Se debe inocular el microorganismo en el medio por 48 horas a 37°C, y posterior a ello añadir gotas de rojo de metilo. Se vuelven de color rojo cuando el resultado es positivo (Microbiologynote, 2023).

- Vogues Proskauer: Logra detectar la fermentación butanodiólica en donde hay menor número de ácidos en comparación a la fermentación ácido-mixta. Al agregarles el rojo de metilo se tornarán de color amarillo con un pH mayor a 6.0 (Microbiologynote, 2023).

- Citrato de Simons: Es un medio que se emplea para probar la capacidad de los microorganismos para usar el amonio como única fuente de nitrógeno y al citrato como única fuente de carbono. Únicamente las bacterias que metabolicen el citrato podrán crecer en este medio y por cambiar el pH con el indicador azul de bromotimol, el color variará de un verde a un azul intenso (MDM, 2021).

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas para diferenciar la especie *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*

V= variable, () % de los resultados positivos, ND: No determinado

Fuente: Bergey *et al*., 1925

PRUEBAS BIOQUÍMICAS	***K. pneumoniae***	***K. oxytoca***
Indol	-(0%)	+(100%)
Urea	+(95%)	+(90%)
Rojo de metilo	-(11%)	V(33%)
Vogues Proskauer	+(93%)	+(96%)
Citrato de Simmons	+(96%)	+(95%)
Pectato	-(0%)	+(100%)
Gas de lactosa a 44.5°C	+(ND)	-(ND)
Crecimiento a 44.5°C	+(98%)	-(0%)
Crecimiento a 41°C	+(ND)	+(ND)
Crecimiento a 10°C	-(1%)	+(100%)
Crecimiento a 4°C	-(0%)	-(ND)

2.1.5.2. Identificación molecular

Los métodos bioquímicos a menudo no logran diferenciar al género *Klebsiella* con exactitud. Para lograr un tratamiento oportuno de diversas infecciones es necesario apoyarse de pruebas diagnósticas que identifiquen a los microorganismos infecciosos de manera específica, sensible y rápida, por ello, las técnicas moleculares son más recomendables (Chander *et al*., 2011) (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Secuencia de cebadores para diferenciar el género *Klebsiella* y especies

Primer	Secuencia (5'-3')	Gen	Producto (pb)
KP (F)	CAA CGG TGT GGT TAC TGA CG	*rpo* B	108
KP (R)	TCTACG AAG TGG CCG TTTTC		
KO (F)	GAT ACG GAG TAT GCC TTT ACG GTG	*peh* X	343
KO (R)	TAG CCT TTA TCA AGC GGA TAC TGG		
Kleb (F)	CGC GTA CTA TAC GCC ATG AAC GTA	*gyr* A	441
Kleb (R)	ACC GTT GAT CAC TTC GGT CAG G		

2.2. Resistencia antimicrobiana

2.2.1. Definición

Las bacterias poseen una gran capacidad para sobrevivir, adaptarse a diferentes medios hostiles y resistir el efecto de los antimicrobianos (Fernández, 2018).

Se denomina resistencia antimicrobiana a la capacidad o facultad que presentan los diversos microorganismos para evitar la acción de los antimicrobianos, llegando así sobrevivir y ejercer un efecto negativo sobre el hospedero. Además, existen factores que favorecen su aparición, entre ellos podemos encontrar, el uso indiscriminado de antimicrobianos en la producción, la subdosificaciones, su consumo sin prescripción médica, su uso sin una previa prueba de sensibilidad in vitro y/o el uso excesivo de antisépticos (Pérez y Robles, 2013; Gastelo *et al*., 2016).

La resistencia antimicrobiana se clasifica en intrínseca o innata y extrínseca o adquirida. La resistencia innata se puede presentar por alteraciones en el ADN, producto de una falla en la fase de replicación y esta característica logra transmitirse a su descendencia. Se ha evidenciado que algunas bacterias logran carecer del sitio de acción del antimicrobiano, así que no cuentan con un lugar donde ejercer su efecto. La resistencia adquirida puede ocurrir por la obtención de material genético proveniente de otras bacterias a través de la transferencia o conjugación mediada por plásmidos o una mutación cromosómica (Pérez, 1998; Martínez, 2014).

Los pacientes que desarrollan infecciones bacterianas a causa de *Klebsiella* spp. son tratados generalmente con betalactámicos, una familia de antimicrobianos que incluye a las cefalosporinas, penicilinas, entre otros, y que, a su vez, el uso excesivo de los mismos como parte del tratamiento, ha conllevado a la aparición de cepas bacterianas resistentes, por lo que ha logrado convertirse en una gran amenaza para la salud pública y animal (Rubin y Pitout, 2014).

El uso de los betalactámicos en Medicina Veterinaria se ha incrementado considerablemente por su fácil biodisponibilidad, el amplio espectro de bacterias que abarca y el bajo costo en comparación a otras familias de antimicrobianos (OMS, 2016).

2.2.2. Mecanismos de resistencia

Debido al hallazgo de los antimicrobianos, durante muchos años se pensó que las enfermedades infecciosas habían sido controladas y en el mejor de los casos, eliminadas. Sin embargo, actualmente las bacterias se encuentran más distribuidas gracias a los mecanismos de resistencia que poseen y/o han adquirido a lo largo del tiempo, generando así, una elevación de los índices de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Por ello, en el año 2015 se llevó a cabo un plan de acción, con la finalidad de hacer frente a la resistencia antimicrobiana con estrategias que logren evadir su diseminación y persistencia en el mundo (OMS, 2016 y Christaki *et al*., 2020).

La resistencia innata es una característica propia de una especie, grupo o familia bacteriana, ya que se transmite de generación en generación, su presencia es independiente a la previa exposición de antibióticos y genéticamente ya se encuentra determinado para efectuar una respuesta frente a la acción de un antibiótico específico. La resistencia adquirida es una condición específica de una cepa bacteriana, la cual previamente ha sufrido una alteración genética que ha logrado cambiar la respuesta de sensibilidad o resistencia de un antibiótico (**Figura 4**). Esta resistencia se lleva a cabo por mutaciones genéticas o por la adquisición de genes, la cual son mediados por plásmidos, integrones o transposones, es por ello su gran diseminación en diversas especies bacterianas (Fernández *et al*., 2003).

2.2.2.1. Modificación o inactivación por acción enzimática

La familia de antibióticos más utilizados y distribuidos son los betalactámicos, los cuales como parte de su estructura tienen en común un anillo betalactámico, y es esa estructura la que suele hidrolizada por la acción de los antibióticos betalactámicos (Moreno *et al*., 2009).

La modificación o inactivación enzimática es considerado el mecanismo más habitual dentro de la clasificación de resistencia adquirida y el de mayor importancia en las bacterias gramnegativas. Consiste en la producción de un conjunto de enzimas que poseen la capacidad de modificar o hidrolizar el sitio de acción, logrando así la inactivación del mecanismo de acción del antibiótico (Reygaert, 2018).

Dentro del grupo de enzimas podemos encontrar como las más representativas a las betalactamasas, las cuales son enzimas que hidrolizan e inactivan el anillo betalactámico del grupo de antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos). La acción de las betalactamasas está codificada por genes que podemos encontrar en el propio cromosoma o en el ADN de los plásmidos de cada bacteria y a nivel plasmídico representa una mayor facilidad para transmitirse entre diferentes especies (Bush y Bradford, 2016).

Las betalactamasas se clasifican en penicilinasas, cefalosporinasas, betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas, siendo este último tipo de enzima la de mayor importancia en la salud humana y veterinaria, ya que representa un gran riesgo porque logra dejar sin efecto la acción de la mayoría, o en algunos casos la totalidad de los grupos de antibióticos existentes (Reygaert, 2018; Pérez y Robles, 2013).

2.2.2.2. Alteración del sitio de acción del antibiótico

Los antibióticos suelen tener como lugar predilecto los diversos componentes que poseen las bacterias, y es ahí donde logran ejercer su acción. Uno de los mecanismos que presentan las bacterias grampositivas para contrarrestar el efecto de los betalactámicos, son las proteínas de unión a penicilina (PBP) que se ubican en la membrana citoplasmática. Las PBP median la síntesis del peptidoglicano y permiten la formación de la pared celular bacteriana y a su vez, es el sitio de unión de los antibióticos betalactámicos. Sin embargo, cuando estos microorganismos logran disminuir y/o modificar sus PBPs, el antibiótico no logra fijarse con facilidad a la estructura bacteriana, por lo que se vuelve resistente (Bush y Bradford, 2016; Pfeifer, 2010).

Alteraciones a nivel de los ribosomas suelen causar la resistencia en aminoglucósidos y en las fluoroquinolonas por modificaciones en los ácidos nucleicos, ya que evitan la unión del fármaco a los componentes mencionados anteriormente (Hawkey, 2003).

2.2.2.3. Bombas de flujo

Son proteínas que tienen como función, mediar la salida o transportar antibióticos, metales pesados, entre otros, desde el medio interior hacia el exterior de la bacteria, con la finalidad de protegerla de agentes externos. Estos transportadores se pueden encontrar en bacterias, células humanas y patógenos como *Candida albicans* (Cannon *et al*., 2009). Se considera que su aparición se dio mucho antes que el de los antibióticos, los cuales buscaban contrarrestar infecciones y actualmente, debido al incremento de casos de resistencia a los antimicrobiana, se busca el desarrollo de fármacos que ejerzan su mecanismo de acción sobre las bombas de expulsión, para lograr inactivar su efecto sobre los antibióticos (Blanco *et al*., 2016).

La resistencia mediada por las bombas de flujo a diferencia de las enzimas como las betalactamasas son inespecíficas, por lo que actúan contra antibióticos como los betalactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, entre otros (Blanco *et al*., 2016; Reygaert, 2018).

2.2.2.4. Impermeabilidad

Diversas sustancias ingresan a las bacterias a través de los canales de porina que presentan. Las porinas son moléculas proteicas que se ubican en la membrana externa de las bacterias gramnegativas y pueden evitar el ingreso de antibióticos cuando se altera la selectividad del canal o existe una disminución de las porinas, logrando así, disminuir la absorción de distintos antibióticos (Kumar y Schweizer, 2005).

Dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, podemos encontrar grupos de bacterias que son resistentes a los antibióticos carbapenémicos, debido a que disminuyen considerablemente el número de porinas, evitando la producción total de las mismas y el ingreso de imipenem u otros fármacos al interior de la bacteria (Reygaert, 2018).

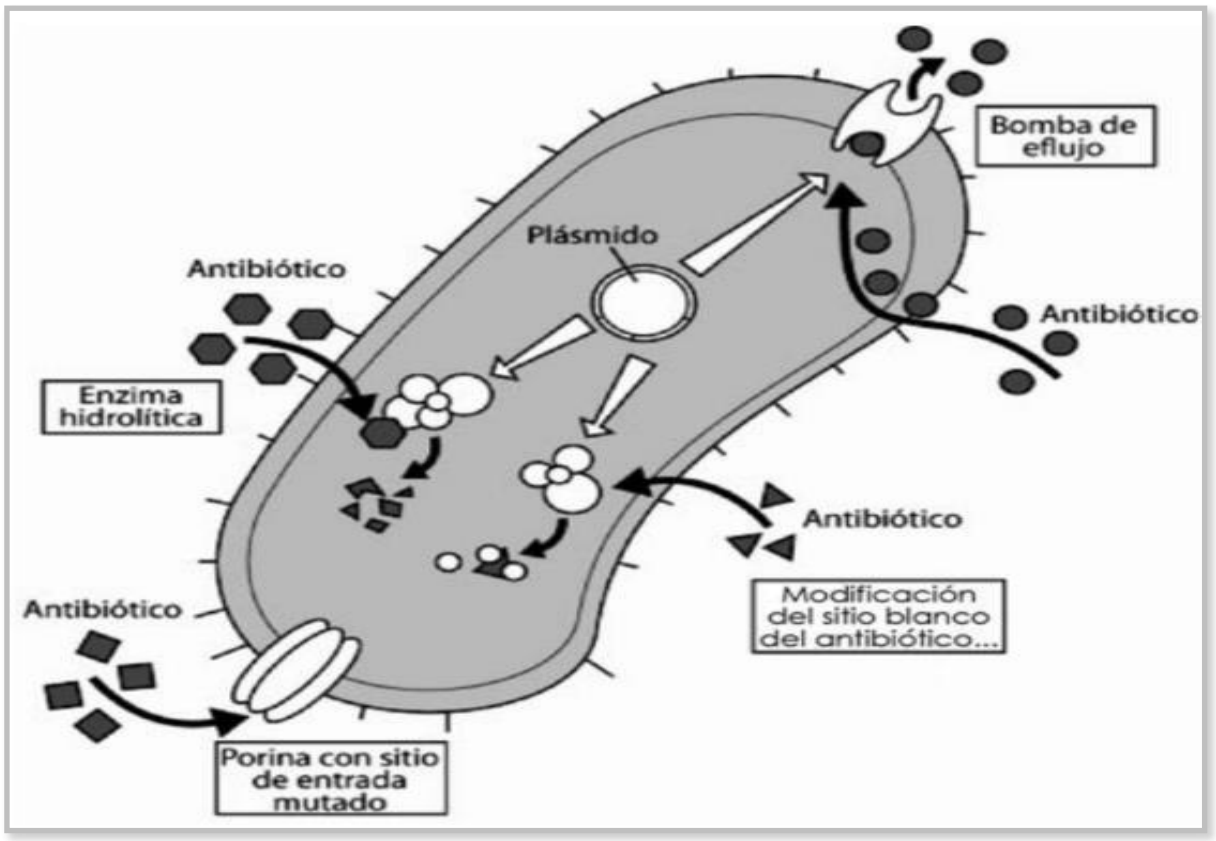


Figura 4: Mecanismos de resistencia antimicrobiana (Moreno *et al*., 2009)

2.2.3. Situación actual

Uno de los principales problemas que genera la aparición de bacterias resistentes y súper resistentes, las cuales han venido apareciendo en las últimas décadas, es que cada vez se hace más complicado hallar una terapia antimicrobiana eficaz, además, el aumento de bacterias resistentes genera una escasez de antimicrobianos, por lo que se estima que existe una tendencia al desabastecimiento de los mismos por la resistencia y nula efectividad que algunos están presentando (Li *et al*., 2018).

En la actualidad, la resistencia antimicrobiana es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial y esto ocasionó que la Organización Mundial de la Salud (OMS) presentara como medida inicial, una lista de bacterias patógenas y peligrosas que ponen en riesgo la salud humana por la capacidad de evadir el efecto de los antimicrobianos. Esta medida tiene como finalidad, concientizar a la población de la gran problemática que existe, como también incentivar a realizar monitoreos, investigación, y la creación de nuevos antimicrobianos que logren contrarrestar dicha resistencia (OMS, 2017). Dentro de la lista publicada por la OMS, se consideraron diferentes

familias de bacterias que fueron clasificadas según la necesidad y urgencia que se tiene para la creación de nuevos fármacos, las cuales se dividieron en prioridad media, alta y crítica. Entre las bacterias de prioridad alta, se incluyó a *Klebsiella* spp. como parte de las enterobacterias, la cual se caracteriza por causar enfermedades nosocomiales en pacientes inmunosuprimidos, pudiendo llegar a ser letal en algunos casos (OMS, 2020).

Debido al incremento anual de fallecidos a causa de la resistencia antimicrobiana, se estima que para el año 2050 existan alrededor de 10 millones de muertes por la misma causa (**Figura 5**), por ello, se busca tener el enfoque de "Una salud", también denominado one health y que el sector humano, ambiental y animal trabajen como una sola unidad y respetando el rol que desempeñan cada uno de ellos (Giono *et al*., 2020).

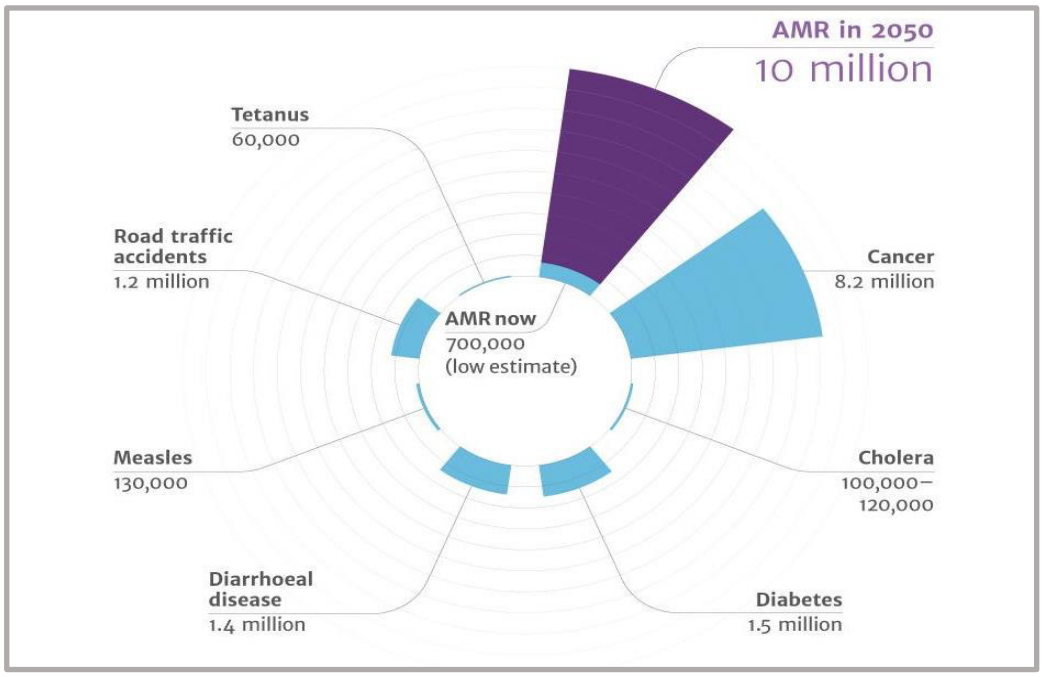


Figura 5: Principales causales de decesos en el año 2050 (McDonell *et al*., 2021)

2.3. Antimicrobianos

2.3.1. Definición

Se le denomina al grupo de antivíricos, antiparasitarios, antifúngicos y antibióticos, los cuales son un conjunto de medicamentos utilizados en animales, seres humanos y plantas para prevenir o tratar diversos grupos de enfermedades (OMS, 2021).

2.3.2. Generalidades

El descubrimiento del primer antibiótico se dio en 1928, cuando Alexander Fleming observó que la presencia del hongo *Penicillium notatum* detenía el crecimiento de *Staphylococcus aereus* en tubos de ensayo (Fleming, 1929; Suárez y Gudiol, 2009). Por ello, se correlacionó que la secreción de alguna sustancia o componente del hongo inhibía el crecimiento bacteriano y es en 1930 cuando la penicilina se utiliza como parte de un tratamiento (Wainwright, 1986; Suárez y Gudiol, 2009).

2.3.3. Antibiótico betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos pertenecen a la clase de antibióticos más utilizados en la práctica clínica, por los bajos niveles de toxicidad que suelen causar en los pacientes que lo consumen como parte de su tratamiento (Suárez y Gudiol, 2009). Reciben ese nombre por su estructura química, la cual consta de un anillo betalactámico y le otorga la actividad antibacteriana, y logra ejercer su acción inhibiendo la última fase de la síntesis de peptidoglicano, componente fundamental para la formación de la pared celular de los agentes bacterianos (Cisneros y Parsons, 2007; Umar *et al*., 2019).

Este grupo de antibióticos se clasifican en cuatro subclases fundamentalmente: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos e inhibidores de las betalactamasas (Suárez y Gudiol, 2009).

2.3.3.1. Estructura y clasificación

A) Penicilinas

Pertenecen al primer grupo de antibióticos descubierto dentro de los betalactámicos y pueden presentar un origen natural o semisintético. Su estructura está compuesta por la unión de un anillo betalactámico con un anillo de tiazolidina, logrando formar el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico (6-APA). Las clases de penicilinas se deben a alguna modificación en la cadena lateral, dando origen a las penicilinas semi sintéticas que poseen diferente acción antibacteriana (Seija y Vignoli, 2008; Yucailla, 2019).

Las penicilinas se clasifican en (**Cuadro 3**):

Cuadro 3. Clasificación de las penicilinas

CLASIFICACIÓN	ANTIBIÓTICOS	ESPECTRO ABARCADO
PENICILINAS NATURALES	Penicilina G	*Streptococcus* *Treponema palidium* *Neisseria meningiditis* *Clostridium*
	Penicilina V	
AMINOPENICILINAS	Ampicilina	El mismo espectro que las penicilinas naturales además de *Enterobacteriaceae* que no produzcan Betalactamasas y *Haemophilus*
	Amoxicilina	
ISOXAZOLILPENICILINAS O ANTI-ESTAFILOCOCÓCICAS	Cloxacilina	*S. aureus* *Staphylococcus spp.* coagulasa negativa resistentes a la penicilina
	Meticilina	
	Oxacilina	
CARBOXIPENICILINAS	Carbenicilina	*Pseudomonas*
	Ticarcilina	
UREIDOPENICILINAS	Piperacilina	
	Mezlocilina	
	Azlocilina	

Realizado por: Emelin Cruz
Fuente: Seija y Vignoli, 2008; Bueno, 2015

B) Cefalosporinas

Después del descubrimiento de la penicilina, continuó la búsqueda de nuevos microorganismos que tengan la capacidad de producir sustancias bactericidas. Por ello, en 1948 un profesor de bacteriología, Giuseppi Brotzu, observó que la presencia de un microorganismo inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, proveniente de aguas de alcantarillado. El

microorganismo inicialmente fue clasificado como *Cephalosporium acremonium*, aunque en la actualidad recibe el nombre de *Acremonium chrysogenum* (Roberts *et al.,* 1983). En 1953 se descubrió que la sustancia bactericida producida por *Acremonium* era la cefalosporina C y dentro del grupo de las cefalosporinas, la cefalotina fue la primera en ser incluida como parte de un tratamiento terapéutico (Schwalbe *et al.,* 2007).

Las cefalosporinas presentan una actividad bactericida y es considerado como uno de los grupos de antibióticos más distribuidos. Se clasifican en cinco generaciones (**Cuadro 4**) y la aparición de cada una de ellas ha ido presentando un mayor espectro en relación al anterior (McCuistion *et al*., 2020).

Cuadro 4. Clasificación de las Cefalosporinas

CLASIFICACIÓN	ANTIBIÓTICOS	PRESENTACIÓN
1RA GENERACIÓN	Cefazolina, Cefalotina, Cefapirina, Cefradina	PARENTERAL
	Cefalexina, Cefadroxilo, Cefradina	ORAL
2DA GENERACIÓN	Cefuroxima, Cefamandol, Cefonicid, Cefotetán, Cefoxitina, Cefmetazol	PARENTERAL
	Cefaclor, Cefuroxima, Cefprozilo, Loracarbef,	ORAL
3RA GENERACIÓN	Cefotaxima, Cefoperazona, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ceftolozano, Ceftizoxima,	PARENTERAL
	Cefixima, Cefdinir, Cefpodoxima, Cefditoreno, Ceftibuteno	ORAL
4TA GENERACIÓN	Cefepima, Cefpiroma	PARENTERAL
5TA GENERACIÓN	Ceftarolina, Ceftobiprol	PARENTERAL

Realizado por: Emelin Cruz
Fuente: Lopardo, 2020

C) Monobactámicos

Como único antibiótico monobactámico aprobado para uso humano se encuentra el Aztreonam. Se caracteriza por poseer un solo anillo betalactámico con una cadena lateral, y deriva

del ácido aminomonobactámico (3-AMA). Ejerce su acción únicamente frente a bacterias gramnegativas aerobias como *Haemophilus influenzae, Pseudomonas spp*, entre otras. A diferencia de otros antibióticos, el Aztreonam presenta pocos o casi nulos efectos secundarios, por ello se recomienda como alternativa a los pacientes alérgicos a la penicilina (Seija y Vignoli, 2008; Schwalbe *et al.,* 2007).

D) Carbapenémicos

El primer antibiótico carbapenémico en ser descubierto fue la tienamicina, también llamada imipenem, y fue hallada a partir de *Streptomyces catleya*. Esta familia de antibióticos está formada por un anillo pirrolidínico insaturado y un anillo betalactámico y son las modificaciones en el carbono 2 las que permiten la creación de nuevos antibióticos, a su vez le otorgan características distintas, ya sea en su vía de administración o espectro alcanzado (Lopardo, 2020).

Dentro del grupo de los carbapenémicos, encontramos al meropenem, ertapenem, imipenem, doripenem y meropenem (**Cuadro 5**), siendo estos tres últimos antibióticos los que presentan una aparición más reciente. Los carbapenémicos se caracterizan por pertenecer al grupo de betalactámicos más usados en cuadros críticos, debido a su amplio espectro (grampositivas y gramnegativas, aerobias y anaerobias) y gran capacidad de acción frente a bacterias resistentes, como las productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) (Gopi y Bonono, 2013; Schwalbe *et al.,* 2007). La elección de los antibióticos mencionados depende del patógeno hallado o las infecciones mixtas con tratamientos limitados que puedan existir (Codjoe y Donkor, 2017).

Se sugiere que su uso sea exclusivo para tratar cuadros infecciosos causados por bacterias resistentes a los betalactámicos, por ello, suelen ser netamente de ámbito hospitalario (Rodrigo, 2010).

Cuadro 5: Clasificación de los carbapenémicos

CLASIFICACIÓN	ANTIBIÓTICOS	PRESENTACIÓN
ERTAPENEM	Presenta una correcta actividad frente a agentes patógenos gramnegativos, a excepción de *Pseudomonas aeruginosa* (Gramnegativo no fermentador) y *Acinetobacter* spp.	Todos los integrantes de la familia de los carbapenémicos son fármacos que se administran parenteralmente ya que no logran absorberse vía oral
DORIPENEM	Es uno de los antibióticos carbapenémicos más reciente y su uso fue aprobado el año 2009. Además, es uno de los más usados para infecciones a causa de *P. aeruginosa*.	
IMIPENEM	Se sugiere para infecciones causadas por *E. faecalis*. Su acción bactericida es menor a la causada por doripenem o meropenem.	
MEROPENEM	Se sugieren para infecciones a causa de bacilos gramnegativos y también ejercen acción sobre las grampositivas	

Realizado por: Emelin Cruz

Fuente: Moreno, 2013

E) Inhibidores de las betalactamasas

El hallazgo de este grupo de betalactámicos surgió por la necesidad de contrarrestar el efecto de los microorganismos productores de enzimas como las betalactamasas, las cuales se caracterizan por inhibir la acción de los betalactámicos (Lopardo, 2020).

Fueron descubiertas en 1970, siendo el ácido clavulánico el primero en ser aislado de la bacteria *Streptomyces clavuligerus* (Lopardo, 2020).

Las betalactamasas son enzimas que ejercen su actividad mediante la hidrólisis del anillo betalactámico y se observó que pueden inhibirse por la presencia de una cloxacilina o EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, por sus siglas en inglés), aunque en la práctica diaria se ha visto que pueden tener un efecto nulo o lograr ser tóxico para el paciente. Los inhibidores de betalactamasas se unen a las betalactamasas gracias a la gran afinidad que presenta, y es esta unión la que impide que el antibiótico betalactámico ejerza su debida acción (Moreno *et al*., 2009).

En la actualidad, los inhibidores de betalactamasas son el tazobactam, sulbactam y ácido clavulánico y todos ellos poseen una estructura betalactámica, aunque su actividad bactericida es limitada, y como parte de un tratamiento terapéutico se recomienda usar un betalactámico con un inhibidor de betalactamasas en conjunto; de esta manera se logra una terapia más efectiva (Almaraz *et al*., 1996; Barcelona *et al*., 2008).

2.3.3.2. Mecanismo de acción de los betalactámicos

El mecanismo que ejercen los betalactámicos es a través de la síntesis del peptidoglucano, lo que conlleva a una inhibición de pared celular bacteriana, por lo que estos microorganismos quedan sin su mecanismo principal de protección (Moreno, 2013) ((**Figura 6**).

Para que se logre dar la formación de la pared celular, el primer paso es la síntesis de dos precursores como el NAM (N-Acetilmurámico) y NAG (N-Acetilglucosamina) a nivel del citoplasma bacteriano. Posterior a ello se da la formación de la cadena peptídica compuesta por diferentes aminoácidos, entre cuatro o cinco aproximadamente (Raisman J, 2005). La unión de los aminoácidos se da en el NAM y para que se logre dar la unión con el NAG, se da el ensamblaje y transporte de precursores gracias a la acción del bactroprenol, el cual tiene como función ensamblar o unir a los precursores NAM y NAG, y permite el transporte del ensamblaje del citoplasma a la pared celular. A continuación, se debe dar la transglicosilación por la glucosiltransferasa, logrando la unión de los segmentos glicosilados como el NAM y NAG. La transpeptidación se encarga de unir la parte peptídica por la transpeptidasa, a nivel del tercer aminoácido de la primera cadena peptídica con la segunda alanina de la segunda cadena peptídica. Dicho entrelazamiento genera que se forme la pared celular bacteriana y evita que este microorganismo se pueda lisar (Suárez y Gudiol, 2009).

Como parte del mecanismo de acción de los betalactámicos, estos ocasionan que la pared celular bacteriana se debilite progresivamente por la inhibición de la transpeptidación; última fase de la síntesis del peptidoglicano, y finalmente la presión osmótica ocasiona la ruptura de la pared celular. Durante la fase de división celular se lleva a cabo la síntesis de peptidoglicano, por ello la acción de los betalactámicos es beneficiada, ya que activan la acción de la autolisina de la bacteria y promueve la no formación de la pared celular (Seija y Vignoli, 2008).

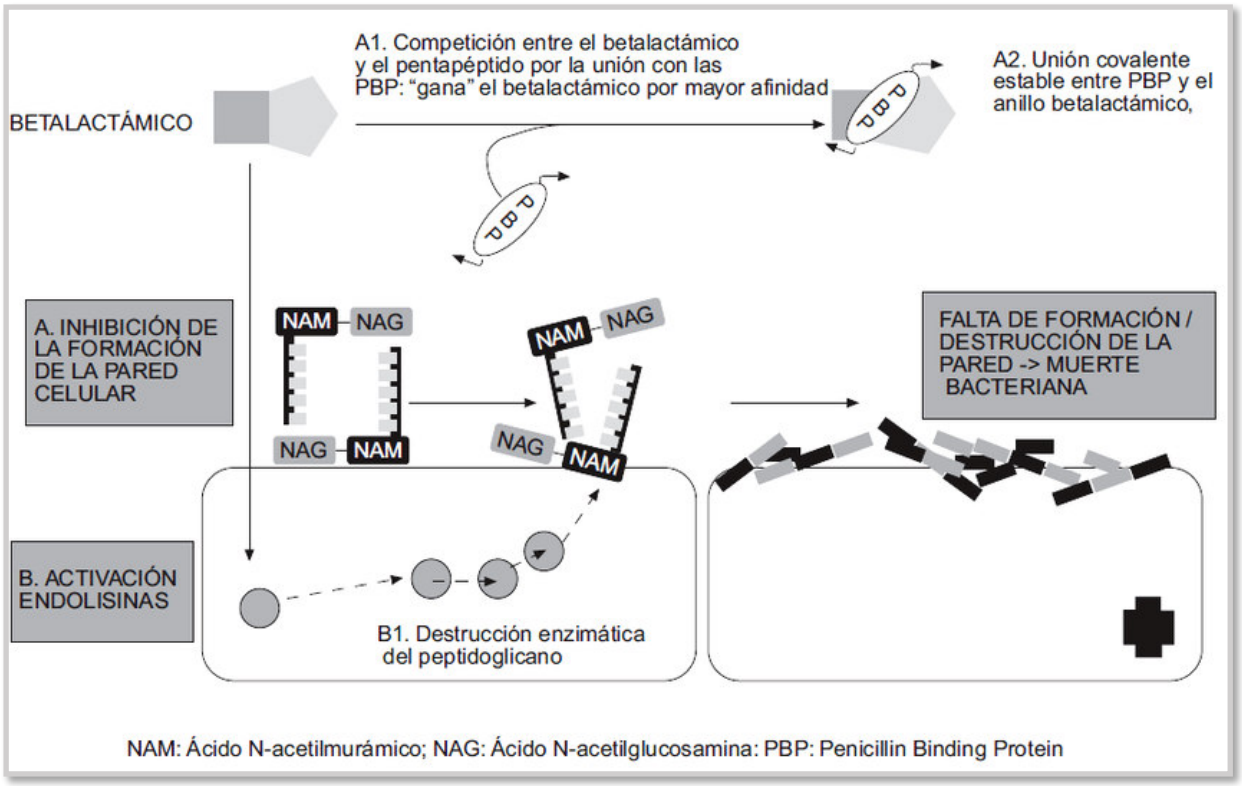


Figura 6. Mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos (Suárez y Gudiol, 2009)

2.4. Betalactamasas

2.4.1. Definición

Las betalactamasas son enzimas que actúan sobre los antibióticos betalactámicos, hidrolizando el anillo betalactámico e inhibiendo que realice su acción bactericida. La producción de estas enzimas es considerada como el mecanismo de resistencia principal de las bacterias gramnegativas (Astocondor, 2018).

La aparición de los antibióticos betalactámicos y su uso cotidiano en la clínica diaria hizo que en 1940 se identifique por primera vez a estas enzimas en una *Escherichia coli* (Máttar y Martínez 2007). Es en el año 1941 que se detecta en el género *Staphylococcus* a las penicilinasas, las cuales le confieren la capacidad de ser resistentes y puedan sobrevivir a pesar de la presencia del antibiótico. Es por ello, que se incrementan los estudios con la finalidad de crear nuevos grupos de antibióticos y contrarrestar a estos organismos resistentes (Morejón M, 2013).

2.4.2. Clasificación

Ambler en el año 1980 clasificó a las betalactamasas de acuerdo con su estructura, la secuencia de sus aminoácidos y la correlación existente entre las enzimas y sus sustratos. Debido a ello, se diferencian cuatro clases como la A, B, C y D (**Cuadro 6**). Las enzimas del grupo B son conocidas como metalobetalactamasas porque requieren de moléculas de Zinc para activarse y realizar su debida acción. Las enzimas A, C y D son nombradas serin-enzimas porque requieren de una serina para mediar el proceso de hidrólisis del anillo betalactámico. La clase A logra agrupar a las serinpenicilinasas, la C a las serincefalosporinasas y la D a las serinoxacilinasas (Bush y Jacoby, 2010).

En 1989 se estableció otra clasificación de las betalactamasas por parte de Karen Bush, y en 1995 Bush, Jacoby y Madeiros generan una nueva clasificación que fue actualizada en el 2010 por Bush y Jacoby, basándose en los pesos moleculares de cada enzima, su capacidad para ser inhibidas por otras sustancias y sus puntos isoeléctricos (Tafur et al., 2008).

Cuadro 6. Clasificación de las enzimas betalactamasas

Clasificación por Bush-Jacoby	Clasificación por Ambler	Sustratos	Inhibidos por		Tipos de enzimas
			Ac. Clavulánico o Tazobactam	Tazobactam	
1	CLASE C	Cefalosporinas	NO	NO	P99, FOX-1, AmpC
1e	CLASE C	Cefalosporinas	NO	NO	GC1, CMY-37
2a	CLASE A	Penicilinas	SÍ	NO	PC1
2b	CLASE A	Penicilinas y cefalosporinas	SÍ	NO	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	CLASE A	Cefalosporinas	SÍ	NO	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
2br	CLASE A	Penicilinas	NO	NO	TEM-30, SHV-10
2ber	CLASE A	Cefalosporinas	NO	NO	TEM-50
2ce	CLASE A	Cefepime	SÍ	NO	RTG-4
2d	CLASE D	Cloxacilina	VARIABLE	NO	OXA-1, OXA-10
2de	CLASE D	Cefalosporinas	VARIABLE	NO	OXA-11, OXA-15
2df	CLASE D	Carbapenémicos	VARIABLE	NO	OXA-23, OXA-48
2e	CLASE A	Cefalosporinas	SÍ	NO	CepA
2f	CLASE A	Carbapenémicos	VARIABLE	NO	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	CLASE B (B1)	Carbapenémicos	NO	SÍ	NDM-1, VIM-2, IMP-1
3b	CLASE B (B2)	Carbapenémicos	NO	SÍ	CphA
3a	CLASE B (B3)	Carbapenémicos			L1

Realizado por: Emelin Cruz

Fuente: Bush y Jacoby, 2010

2.4.3. Carbapenemasas

La producción de enzimas como las carbapenemasas son consideradas como el mecanismo de mayor relevancia en la resistencia a los carbapenémicos. Estas enzimas actúan hidrolizando el anillo betalactámico de los carbapenémicos, aunque también logran actuar frente a los otros grupos de betalactámicos, ya que la especificidad varía de acuerdo a la presencia de cada enzima (Moreno, 2013).

Las carbapenemasas pueden ser codificadas a nivel del ADN bacteriano o en elementos móviles como los plásmidos, los cuales son de fácil transferencia y diseminación. Según la clasificación de Ambler, las carbapenemasas se pueden diferenciar en los grupos A, D o B (**Figura 7**). Inicialmente estas enzimas se aislaron en bacterias gramnegativas no fermentadoras, tales como las del género *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, sin embargo, cada vez es más frecuente encontrarlas en enterobacterias (Bush y Jacoby, 2010).

Los tipos de carbapenemasas más encontrados en *Klebsiella* spp en humanos según la alerta epidemiológica de la OPS/OMS del 2021 mencionan como principal cepa a la de tipo KPC, llegando a ser endémica en países como Argentina, Ecuador, entre otros. Seguida a la presencia de esta enzima se encuentra a NDM y OXA -48, y en menor medida a IMP y VIM (OPS y OMS, 2021).

2.4.3.1. Clasificación

- CLASE A

Esta clase de enzimas es considerada la más diversa y la de mayor diseminación, logrando ser un gran riesgo para la salud mundial (Vera *et al*., 2017).

- ✓ SME, IMI, NMC-A:

Este grupo enzimas son codificadas a nivel del cromosoma. Ejercen su acción sobre las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos, y no se han detectado en el género *Pseudomonas*. En *Serratia marcescens* se aisló a la enzima SME en el año 1982, mientras que en las *Enterobacter* spp. a NMC-A e IMI (Vera *et al*., 2017).

✓ GES:

Estas siglas provienen de Guiana Extended-Spectrum y se descubrieron por primera vez en una cepa de *K. pneumoniae* en el año 2000. Posee un gran parecido a los aminoácidos de las KPC-2 y las SME-1. Su hallazgo no suele ser muy común en comparación al resto de enzimas, aunque se han encontrado en todos los continentes. Principalmente ha sido hallado en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aunque también en algunos miembros de *Enterobacteriaceae* (Bueno, 2015; Vera *et al*., 2017).

✓ KPC:

Son las enzimas de mayor importancia debido a que son codificados en los transposones, incrementando su capacidad para diseminarse (Queenan y Bush, 2007). Se describieron por primera vez en Estados Unidos en el año 1996 y sus siglas se debe a que fueron encontradas en una cepa de *K. pneumoniae* (Bueno, 2015). Las variantes existentes se diferencian por uno a tres aminoácidos y estas enzimas suelen encontrarse en el género *Klebsiella*, aunque también podemos encontrarlas en otras enterobacterias o en *P. aeruginosa*. El hallazgo de estas enzimas se va incrementando gradualmente y en el año 2003 en Nueva York, se presentaron dos brotes de *K. pneumoniae* portadores de carbapenemasas, haciendo limitada la lista de antibióticos que podían usar a causa de dicha resistencia bacteriana (Bratu *et al*., 2005).

➢ CLASE B

Se caracterizan por hidrolizar a toda la familia de los carbapenémicos, a excepción de los monobactámicos (aztreonam) y son inhibidos por acción de EDTA, el cual actúa como un agente quelante. Este grupo de enzimas podemos encontrarlas en *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas spp*., enterobacterias, entre otros (Bueno, 2015).

✓ VIM:

Es una metalobetalactamasa Verona codificada por integrón (VIM) que inicialmente fue aislada en Verona (Italia) en 1997, proveniente de una *P. aeruginosa*. Hidroliza a todos los grupos de betalactámicos excepto los monobactámicos y cefiderocol , es por ello por lo que limita considerablemente las opciones de tratamiento. Pueden codificarse en los transposones o integrones, junto a más genes de resistencia que le da la capacidad de formar cepas multirresistentes (Bueno, 2015; Queenan y Bush, 2007).

- ✓ NDM:

Reciben el nombre de Nueva Delhi Metalobetalactamasa (NDM) a causa de que fueron descubiertas en el 2008 en un paciente de la India que inicialmente estuvo hospitalizado en Nueva Delhi por una infección urinaria a causa de *K. pneumoniae*. Dentro de los subtipos, el más difundido es la NDM-1 que se codifica a nivel de plásmidos. Estas enzimas se encuentran en todos los continentes por su rápida diseminación y su detección es de gran importancia (Berrazeg *et al*., 2014; Bueno, 2015).

- ✓ IMP:

Se aisló por primera vez en una enterobacteria como *Serratia marcescens* en Japón. Fue la primera carbapenemasa que lograba hidrolizar al imipenem mediada por plásmidos, dándole la característica de resistente a dicho antibiótico. En diversos países se están encontrando cepas de *P. aeruginosa* con presencia de esta enzima (Watanabe *et al*., 1991).

La casuística en el Caribe y gran parte de América Latina es del 1-16%, y en el Perú el primer caso reportado fue en un hospital público de Lima el año 2011 (Vargas *et al*., 2017).

- ➢ CLASE D

- ✓ OXA:

Lo conforman gran variedad de oxacilinasas. Actúan inhibiendo antibióticos como la oxacilina, cloxacilina e incluso a los carbapenémicos. Una de sus características principales es que no son inhibidas por quelantes como el EDTA y su inhibición es variable con respecto al ácido clavulánico, por ello siempre se recomienda que su detección se confirme por métodos moleculares (Nordmann *et al*., 2011).

Existen diversos tipos, como el OXA-23, 40, 48, entre otros, y la primera enzima OXA-48 se aisló el 2003 en Turquía, proveniente de una cepa de *K. pneumoniae* (Martínez y Calvo, 2010).

En los últimos años se ha observado una mayor presencia de OXA-48 en enterobacterias, y en menor grado a las OXA-23 en cepas de *Proteus mirabilis* (Bueno, 2015).

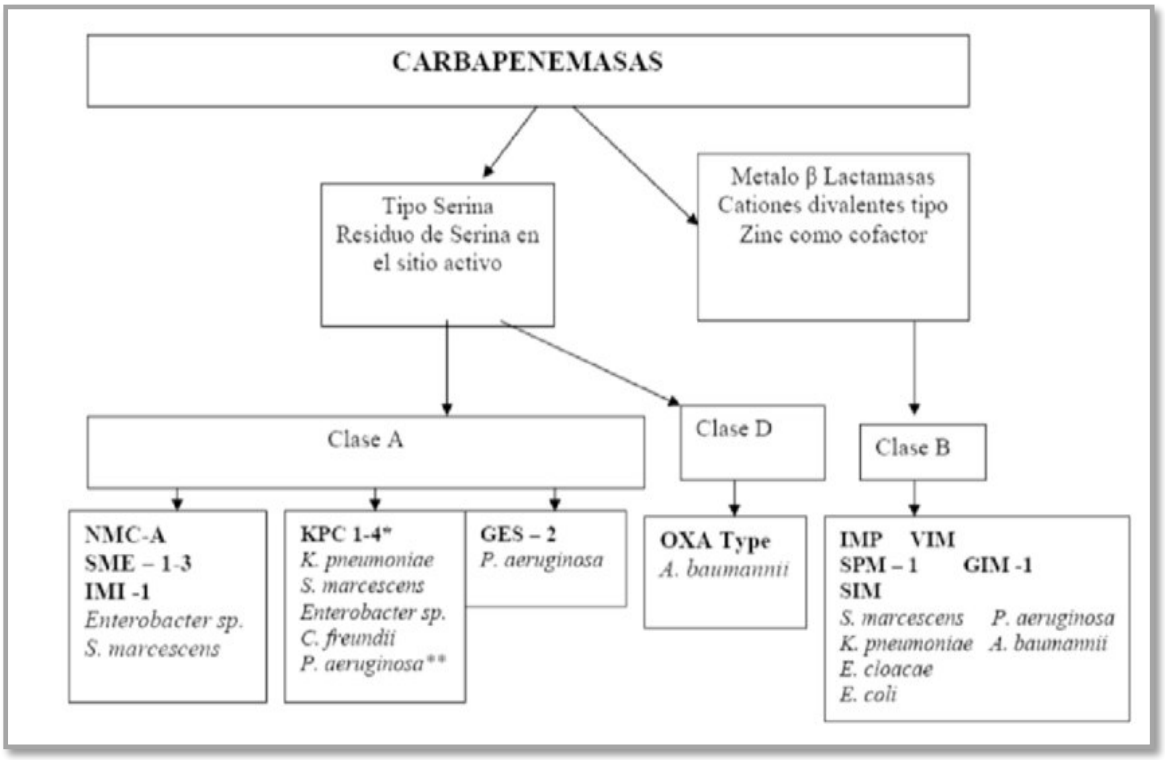


Figura 7: Clasificación de las Carbapenemasas (Tafur *et al*., 2008)

2.4.3.2. Riesgo para la salud pública la transmisión de genes de resistencia de animales de compañía

En estos últimos 50 años, la población de perros y gatos se ha incrementado sustancialmente, llevando consigo un cambio de rol de los mismos en la sociedad. En busca del bienestar de los animales, el estrecho contacto entre los propietarios y sus mascotas se ha incrementado, y el riesgo de adquirir bacterias con genes de resistencia también ha crecido (Pomba *et al*., 2016).

Las bacterias multidrogorresistentes se suelen compartir entre animales y humanos. La dirección de la transferencia de genes de resistencia es complicada de probar pero la adquisición de estos genes hace que se incrementen el número de fallecidos a causa del fracaso de un tratamiento terapéutico e incremento en la morbilidad a causa de la aparición y adquisición de estos genes (Angles *et al*., 2020).

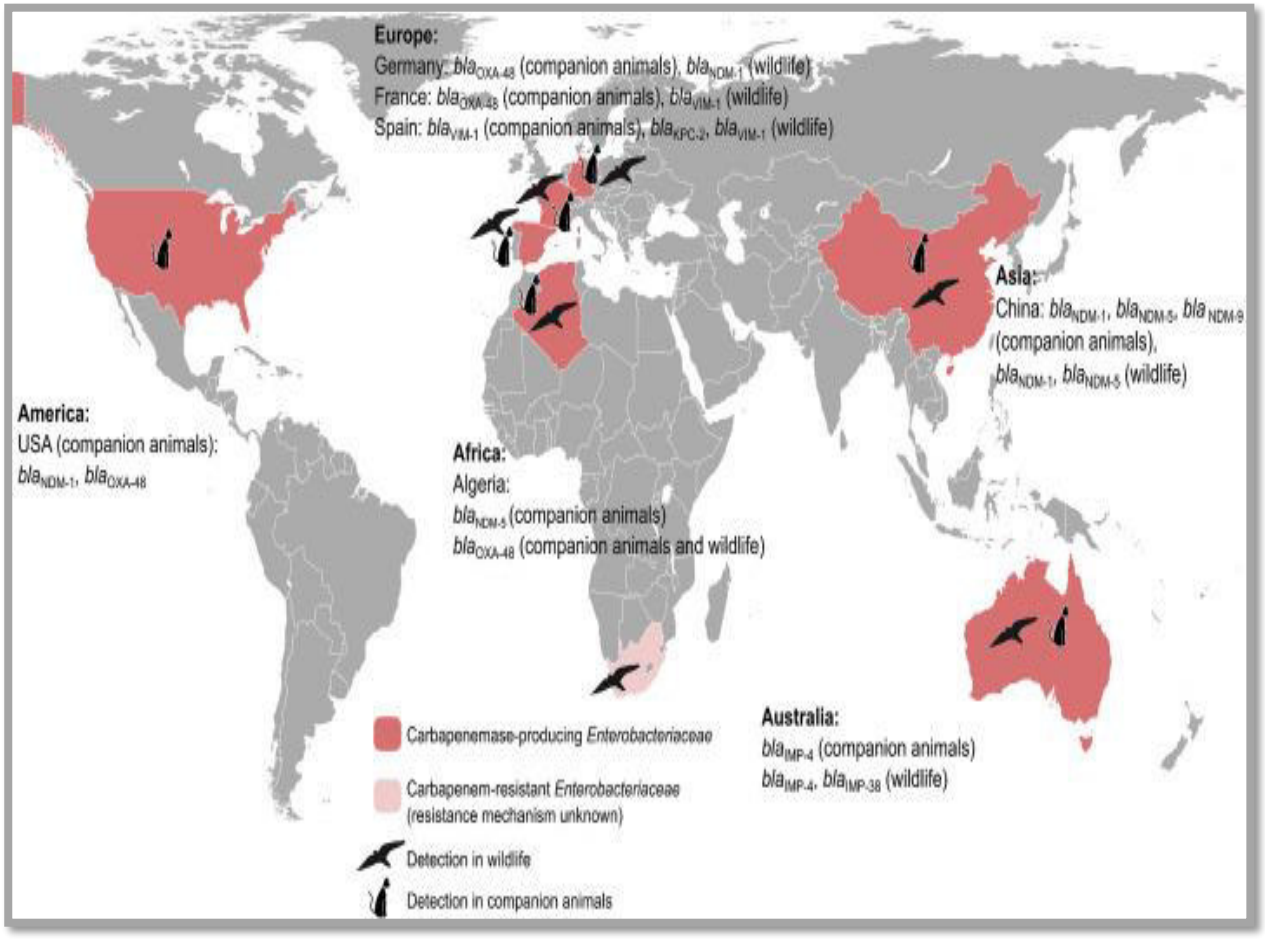
2.5. Impacto de *Klebsiella* productoras de carbapenemasas en animales de compañía

En humanos, las enfermedades causadas por *Klebsiella* se asocian a pacientes hospitalizados, inmunocomprometidos, y/o que padecen enfermedades crónicas, es por ello por lo que se denomina patógeno oportunista, aunque últimos reportes han evidenciado el hallazgo de esta bacteria en personas sin enfermedades previas, lo que indicaría su mayor difusión en la comunidad (**Figura 8**) y la importancia de una vigilancia epidemiológica (Harada *et al*., 2019). Dentro de este género, la especie de mayor importancia es *K. pneumoniae* y en menor proporción se encuentra *K. oxytoca* (Podschun y Ullmann, 1998).

El número de animales de compañía ha mostrado un incremento considerable, más aún en países desarrollados, y se estima que la tendencia será al continuo crecimiento. Las políticas de bienestar animal han conllevado a que se priorice la salud de los mismos. En la actualidad, el uso de carbapenémicos suele ser prohibido en medicina veterinaria, a excepción de casos específicos que demuestran ser intratables y extraños, sin embargo debido a la creciente de infecciones causadas por cepas multirresistentes, se ha tratado de promover pautas que ayuden al uso correcto de carbapenémicos (González *et al*., 2016). A causa de la mayor evidencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) en humanos y su aparición esporádica en animales, la hipótesis de una transmisión de humanos a animales es cada vez más certera. La mayor cercanía que evidencian las mascotas con sus dueños ha hecho más probable la transmisión de genes de resistencia desde los humanos hacia sus respectivas mascotas, también denominado zooantroponosis y la adquisición de genes de resistencia se debe a la probable contaminación del

propietario, quien según algunos estudios han estado relacionados a enfermedades humanas o en algún momento de su vida se internaron en centros hospitalarios (Marques *et al*., 2019).

Figura 8: Distribución mundial de enterobacterias con genes de carbapenemasas en animales de compañía y vida silvestre (Köck *et al*., 2018)



III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño de estudio

Este proyecto tuvo como finalidad detectar genes de resistencia, específicamente carbapenemasas en aislados de *Klebsiella* spp. procedentes de perros y gatos con cuadros clínicos durante los años 2018 y 2022, los cuales forman parte del cepario del Laboratorio de Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se evaluó la totalidad del cepario, obteniendo 41 aislados que previamente fueron identificados por su morfología macroscópica, microscópica, pruebas bioquímicas y posteriormente mediante la técnica de PCR.

3.2. Lugar de ejecución y periodo de duración

El estudio se desarrolló en las instalaciones del laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria - Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), con un intervalo desde el 2021-2022.

3.3. Descripción del material experimental

Se evaluaron 41 aislados de *Klebsiella spp*. provenientes de perros y gatos con cuadros clínicos, las cuales fueron obtenidas a través de muestras de orina, abscesos, hisopados de piel, oídos y rectales. Dichas muestras se remitieron al laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria - Sección Bacteriología y Micología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) para su respectivo procesamiento, aislamiento e identificación macroscópica, como el uso de pruebas bioquímicas y PCR durante el periodo 2018-2022. Posterior a la identificación, los aislados fueron criopreservados y formaron parte del cepario del laboratorio en mención. Para este estudio se utilizó toda la población de *Klebsiella spp*., las cuales previamente se reactivaron.

3.4. Materiales y equipos

3.4.1. Material biológico

Para la prueba de PCR se utilizaron controles positivos, los cuales fueron: bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP-1} y bla_{IMP-2} otorgadas por la Universidad Peruana Cayetano Heredia a través de aislados bacterianos. Los controles positivos forman parte de otro proyecto por publicar, y previamente fueron detectadas a través de inmunocromatografía Coris BioConcept (Anexo 5) y posterior a ello, para confirmar la presencia o ausencia de genes de carbapenemasas, a través de PCR y el respectivo secuenciamiento. Además, se hizo uso de la totalidad de 41 aislados de *Klebsiella* spp. Como control negativo se usó una cepa ATCC 43300 (*Staphylococcus aureus*).

Los controles positivos brindados tienen la siguiente identificación:

- ✓ A26 - *Citrobacter* sp. - gen bla_{KPC}
- ✓ A29 - *Enterobacter* sp. - gen bla_{NDM}
- ✓ A30 - *Enterobacter* sp. - gen bla_{OXA-48}
- ✓ A24 - *Pseudomonas* sp. - gen bla_{IMP-1} y bla_{IMP-2}

3.4.2. Materiales

- ✓ Guantes de nitrilo
- ✓ Cofias
- ✓ Mascarillas descartables
- ✓ Mechero
- ✓ Ansas circulares y en punta
- ✓ Placas Petri de vidrio 100 x 15 mm y plástico 60 x 15 mm
- ✓ Viales cónicos y redondos estériles de 1.5 y 2 ml (*Eppendorf*)
- ✓ Micropipetas de 10, 100 y 1000 µl (*Eppendorf*)
- ✓ Tips o punteras de micropipetas estériles de 10, 100 y 1000 µl (*Eppendorf*)
- ✓ Gradillas para tubos de ensayo
- ✓ Racks de congelación
- ✓ Alcohol de 70°
- ✓ Agua destilada
- ✓ Papel parafilm

3.4.3. Equipos de laboratorio

- ✓ Baño maría
- ✓ Bloque de calor (*Thermo Scientific*)
- ✓ Estufa de PRECISION con límite máximo de temperatura 60°C (*Thelco)*
- ✓ Equipo para electroforesis (*Cleaver scientific*)
- ✓ Espectrofotómetro DS-11Fx (*DeNovix*)
- ✓ Transiluminador SafeVIEW- Mini2 luz azul (*Cleaver scientific*)
- ✓ Congeladora de -20°C (*Bosch®)*
- ✓ Vortex mixer (*Isolab*)
- ✓ Caja limpiadora UV para ADN/ARN (*BioSan*)
- ✓ Mechero
- ✓ Refrigeradora a 4°C
- ✓ Microcentrífuga vórtex (*BioSan*)
- ✓ Termociclador Biometra TOne (*Analytik Jena*)

3.4.4. Reactivos

- ✓ Kit de extracción de ADN para bacterias Gram negativas (*GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit*)
- ✓ Agua ultra pura - libre de nucleasas IDT (*INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES*)
- ✓ DNTPs Mix (*Applied Biological Materials*)
- ✓ EDTA 50mM
- ✓ Buffer TBE 10x (*Cleaver Scientific)*
- ✓ DreamTaq DNA Polimerase (*Thermo Scientific*)
- ✓ Agarosa (*PROMEGA*)
- ✓ Marcador de peso molecular de 100pb (*Applied Biological Materials*)
- ✓ Marcador de peso molecular de 50pb (*Applied Biological Materials*)
- ✓ Lisozima 50mg/ml (*Merck*)
- ✓ Agar McConkey
- ✓ Caldo Tripticasa de Soya (TSB)

3.5. Metodología

3.5.1. Reactivación de aislados

Las cepas de *Klebsiella* se encontraban criopreservadas en microviales con glicerol al 15% y a una temperatura de -20°C, para hacer uso de ellos, se procedió a reactivarlos. Este proceso consistió en extraer 100uL de cada vial previa homogenización, y se colocó en 1mL de caldo Tripticasa de soja (TSB), con la finalidad de ofrecer un medio de enriquecimiento a las bacterias criopreservadas y puedan crecer de manera óptima. Cada vial se incubó a 37°C durante 18-24 horas, y posterior a ello se sembró en agar McConkey para la visualización de las colonias (Álvarez, 2019) (**Figura 9**).

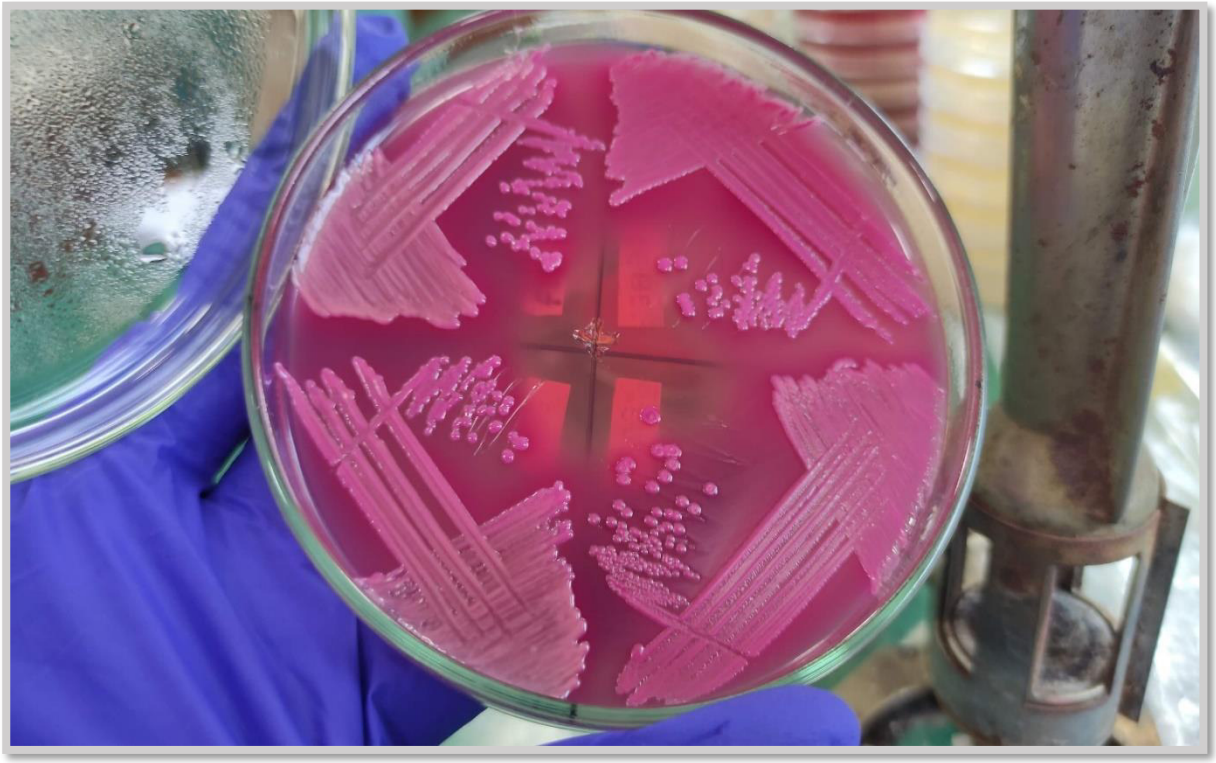


Figura 9: Crecimiento de colonias de *Klebsiella* spp. en agar Mc Conkey

3.5.2. Extracción de ADN

Se realizó la extracción del ADN genómico a través de un kit de extracción de ADN (GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit), siguiendo las instrucciones mencionadas por el fabricante.

Como primer paso, se tomó una colonia fresca de *Klebsiella* sp. aislada en agar McConkey y se prosiguió a colocarla en un caldo TSB para su posterior incubación y crecimiento durante 18-24 horas en la estufa. Posteriormente, se tomó con la ayuda de una pipeta unos 1.5 a 2ml de caldo y se centrifugó a 5000 RPM (Revoluciones Por Minuto) para eliminar el sobrenadante y quedarnos con el pellet. El pellet fue resuspendido en un buffer de lisis, el cual fue preparado siguiendo las instrucciones mencionadas y seguidamente se continuó con la metodología asignada por el fabricante del kit de extracción (ANEXO 1).

Cuando el ADN ya fue extraído, se cuantificaron todas las muestras mediante espectrofotometría, y luego fue conservado y almacenado a -20°C hasta el momento de su uso.

3.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa

Para el desarrollo de la estandarización de PCR, se tomó como referencia el protocolo utilizado por Watahiki *et al*., (2020), aunque se le realizaron algunas modificaciones en tiempo y temperatura, y también se hizo uso de los cebadores utilizados (**Cuadro 7**).

La identificación del gen *bla*$_{KPC}$ se llevó a cabo realizando una reacción de PCR, la cual tenía un volumen total de 20 µl por reacción y consistía en lo siguiente: 4 µl de solución buffer tampón X, 1 µl de magnesio, 0.2 µM de los desoxinucleósido trifosfato (0.4 µl dNTPs), 0.2 µl de Taq polimerasa, 0.2 µM de cada cebador *bla*$_{KPC}$ (forward y reverse conjuntamente) y 1 µl del ADN extraído. Se utiliza el agua ultra pura estéril para completar el volumen final de 20 µl (13 µl).

Para el gen *bla*$_{IMP-1}$ y *bla*$_{IMP-2}$ cada reacción tenía un volumen total de 20 µl y consistía en lo siguiente: 4 µl de solución buffer tampón X, 1.2 µl de magnesio, 0.2 µM de los desoxinucleósido trifosfato (0.4 µl dNTPs), 0.2 µl de Taq polimerasa, 0.2 µM por cada cebador *bla*$_{IMP-1}$ (forward y reverse conjuntamente), 0.2 µM por cada cebador *bla*$_{IMP-2}$ (forward y reverse conjuntamente) y 1 µl del ADN extraído. Se utiliza el agua ultra pura estéril para completar el volumen final de 20 µl (12.4 µl).

Con el gen *bla*$_{OXA-48}$ cada reacción consta de un volumen total de 20 µl y está conformado de la siguiente forma: 2 µl de la solución buffer tampón X más el magnesio, 0.2 µM de los desoxinucleósido trifosfato (0.4 µl dNTPs), 0.2 µl de Taq polimerasa, 0.2 µM por cada cebador *bla*$_{OXA-48}$ (forward y reverse conjuntamente) y 1 µl del ADN extraído. Se complementa el restante de la reacción con agua ultra pura estéril hasta alcanzar los 20 µl totales (16 µl).

Para el gen *bla*$_{NDM}$ de igual forma cada reacción consta de un volumen total de 20 µl y está conformado de la siguiente forma: 2 µl de la solución buffer tampón X más el magnesio, 0.2 µM de los desoxinucleósido trifosfato (0.4 µl dNTPs), 0.2 µl de Taq polimerasa, 0.2 µM por cada cebador *bla*$_{NDM}$ (forward y reverse conjuntamente) y 1 µl del ADN extraído. Se complementa el restante de la reacción con agua ultra pura estéril hasta alcanzar los 20 µl totales (16 µl).

Los productos de los PCR se estandarizaron bajo las siguientes condiciones: Una desnaturalización inicial de 95°C durante 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C de desnaturalización durante 30 segundos. La temperatura de hibridación dependió de cada gen y fue por 90 segundos, 72°C para la extensión durante un minuto y la extensión final a 68°C durante 10 minutos. Dicha información se encuentra detallada en el cuadro siguiente:

Cuadro 7. Secuencia de cebadores para los genes de carbapenemasas

GENES/ UBICACIÓN	PRIMER	SECUENCIA 5´→3'	PRODUCTO (pb)	ANNELING	REFERENCIA
bla KPC (plasmídicos)	kpc-f	CGGAACCATTCGCTAAACTCG	322	63°C	Watahiki *et al*., (2020)
	kpc-r	AACAAATTGGCGGCGGCGT			
*bla*OXA-48 (genómico y plasmídico)	oxa48-f	GCTCTGGAATGAGAATAAGCAGCA	125		
	oxa48-r	TAACCACGCCCAAATCGAG			
bla NDM (plasmídicos)	ndm-f	CGGTTTGGCGATCTGGTTTT	207	64°C	
	ndm-r	GACCGGCAGGTTGATCTCC			
*bla*IMP-1 y *bla*IMP-2 (genómico y plasmídico)	imp-f1	TCTCRATCTATCCCCACGTATGC	269	65°C	
	imp-f2	TCTCAATCTATTCCAACATATGCATCTG			
	imp-r1	GCGGACTTTGGCCAAGCTTCTA			
	imp-r2	GCMGAATGTGGCCACGCTTCAA			

3.5.4. Electroforesis en gel de agarosa

Los productos obtenidos (de la amplificación por PCR) fueron visualizados mediante una corrida electroforética, para lo cual se preparó un gel de agarosa al 2%. Posterior a ello, se colocó el gel en la cámara de electroforesis para luego agregarle el buffer TBE al 0.5X. Cada producto obtenido por la PCR se mezcló con el buffer de carga SafeGreen (*Applied Biological Materials),* siendo 1 µl de buffer por cada 5 µl de muestra amplificada y cada mezcla fue colocada en un respectivo pocillo dentro del gel de agarosa. Además, se utilizó un marcador de peso molecular de 100bp Opti DNA Marker para conocer con exactitud la posición de cada banda que comenzará a revelarse. Cada electroforesis se programó con 85 voltios por 95 minutos. Para la visualización de los productos se colocó al gel en un transiluminador SafeVIEW de luz azul.

IV. RESULTADOS

En el presente estudio, de un total de 41 aislados de *Klebsiell*a sp. provenientes de perros y gatos con cuadros clínicos, 5 aislados presentaron genes de carbapenemasas.

De los aislados que presentaron genes de carbapenemasas, el aislado identificado como E244 poseía dos genes de carbapenemasas (bla_{KPC} y bla_{NDM}) (**Figura 10** y **Figura 11**), representando un 2.4% (1/41), mientras que los aislados identificados como aislados E137, E169, E171 y E220 poseían el gen bla_{OXA-48} (**Figura 12**), lo que representa a un 9.8% (4/41).

En ninguno de los aislados de *Klebsiell*a sp. evaluados en el presente trabajo se detectaron los genes bla_{IMP-1} y bla_{IMP-2} (**Figura 13**).

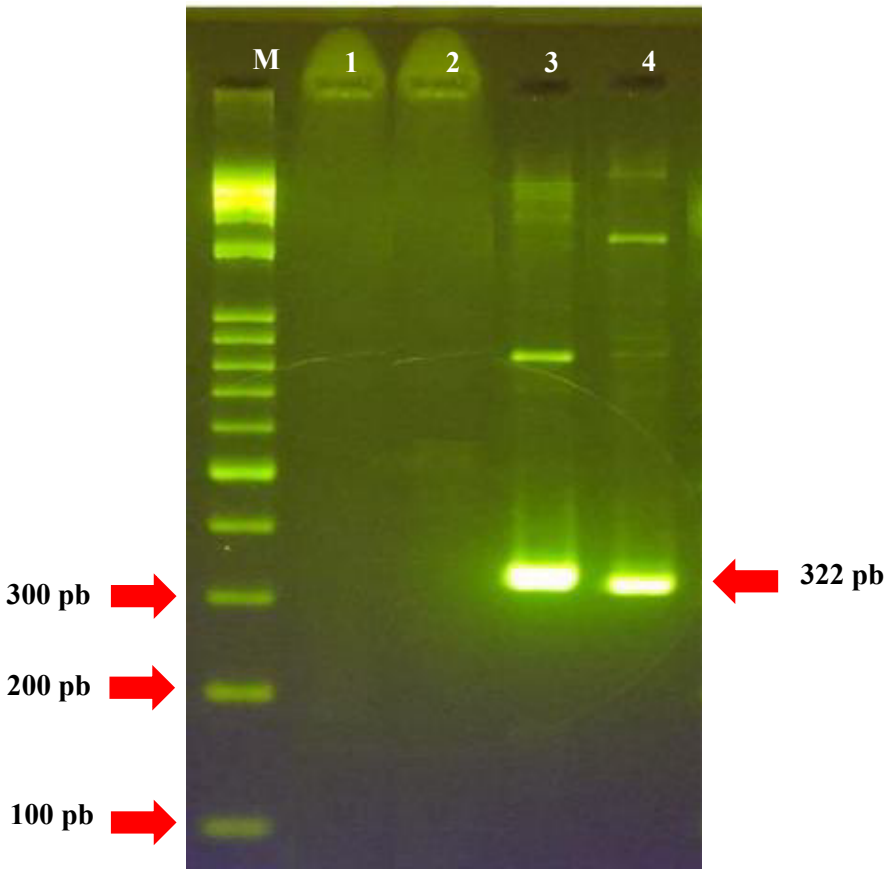


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. **M**: Marcador molecular de 100pb. **Carril 1: Reacción blanco** (control). **Carril 2: Control negativo cepa ATCC 43300** (*Staphylococcus aureus*). **Carril 3: Control positivo A26** (*Citrobacter* sp.). **Carril 4:** *K. pneumoniae* cepa E220 con gen *bla*$_{KPC}$ de 322 pb.

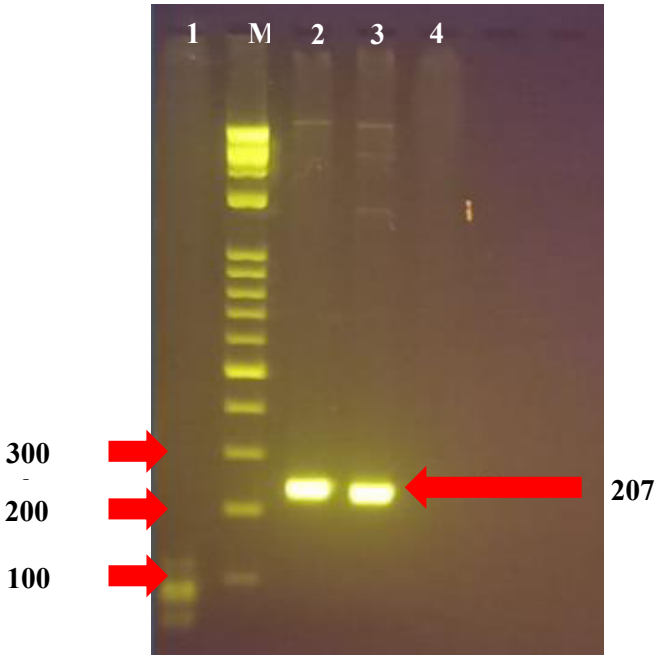


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. **M:** Marcador molecular de 100 pb. **Carril 1: Control negativo cepa ATCC 43300** (*Staphylococcus aureus*)**. Carril 2: Control positivo cepa A29** (*Enterobacter* sp.). **Carril 3:** *K. pneumoniae* cepa E244 con presencia de gen *bla*$_{NDM}$ de 207 pb. **Carril 4: Reacción blanco** (control).

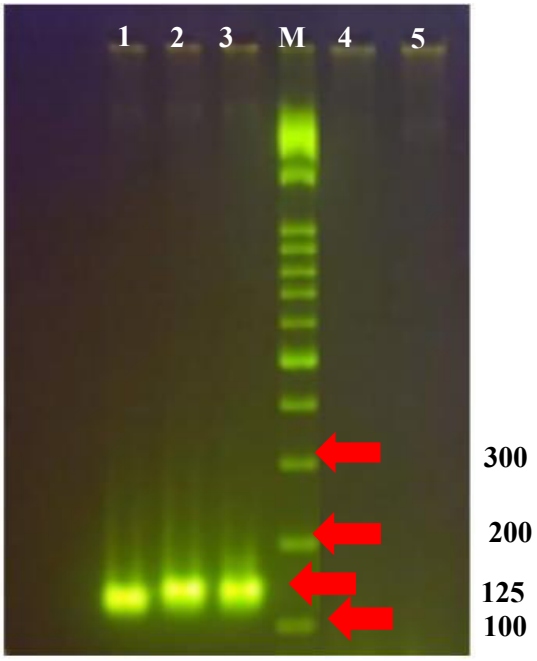


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa al 2%. **M:** Marcador molecular de 100 pb. **Carril 1: Control positivo cepa A30** (*Enterobacter* sp.). **Carril 2,3**: *Klebsiella* spp cepas E169 y E171 con presencia de gen *bla*$_{\text{OXA-48}}$ de 125 pb. **Carril 4: Control negativo cepa ATCC 43300. Carril 5: Reacción blanco** (control).

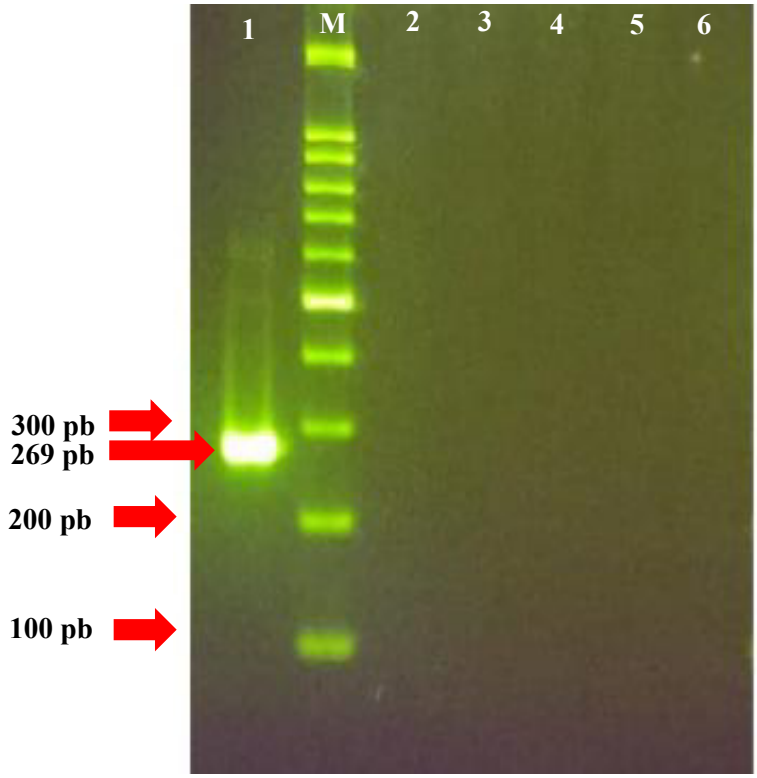


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. **M:** Marcador molecular de 100 pb. **Carril 1: Control positivo cepa A24** (*Pseudomonas* sp). **Carril 2**: **Control negativo cepa ATCC 43300** (*Staphylococcus aureus*). **Carril 3,4 y 5:** cepas E140, E167 y E200 de *K. pneumoniae* con ausencia de gen *bla*$_{\text{IMP-1}}$ y *bla*$_{\text{IMP-2}}$ de 269 pb. **Carril 6: Reacción blanco** (control).

V. DISCUSIÓN

El género *Klebsiella* es considerado como uno de los mayores patógenos bacterianos con capacidad de causar una gran variedad de enfermedades, principalmente por la acción de *K. pneumoniae*. Esta especie puede ser hallada en humanos y animales sanos o enfermos, además que en los últimos años se han reportado casos mundialmente de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC) en animales de compañía, tales como lo encontrado por Cole y Rakin, (2022), quienes hallaron EPC en dos perros de 6 y 3 años respectivamente, siendo una actividad que muchas veces pasa desapercibida en animales y eso lo convierte en una gran problemática para el control y monitoreo de enfermedades. Por ello, el presente trabajo se enfocó en la detección de *Klebsiella* spp productoras de carbapenemasas provenientes de perros y gatos con cuadros clínicos como hospedero primordial para el hallazgo de estas enzimas.

En la presente investigación se evaluaron 41 cepas de *Klebsiella* spp. provenientes de perros y gatos con cuadros clínicos para la detección de genes bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP-1} y bla_{IMP-2} mediante PCR convencional, mientras que el trabajo realizado por Lechinski (2019), quien también hizo una detección molecular de genes asociados a carbapenemasas, utilizó 65 aislados en Brasil. Así, este es el primer reporte que detecta aislados positivos en perros y gatos en el Perú, siendo de gran importancia para que futuras investigaciones se enfoquen en la vigilancia epidemiológica de muestras provenientes de veterinaria.

En el presente estudio, las cepas de *Klebsiella* sp., fueron aisladas de perros y gatos con diferentes patologías, teniendo en común con la publicación de Marques y colaboradores (2021) cuadros de infecciones urinarias, neumonías, y otitis. Estos cuadros corroboran la capacidad oportunista que presenta el género *Klebsiella* sp. ante la baja inmunidad del huésped,

aprovechando su colonización y manifestación. Este hallazgo podría deberse a que las condiciones de crianza que hay entre ambos países son muy similares, tanto en el cuidado sanitario, como la tenencia responsable por parte de los propietarios (Silva *et al*., 2005).

De las 41 muestras obtenidas provenientes de perros y gatos con cuadros clínicos, predominaron las enfermedades causadas por infecciones del sistema urinario (39%). Algunos reportes mencionan el hallazgo frecuente de *Klebsiella* sp. en perros y gatos en este tipo de infección con un 13.2% y 12.9% respectivamente (Ochoa *et al*., 2022, Jordan *et al*., 2019). Esto se debería a que uno de los factores que favorecen la aparición de infecciones urinarias sería por la conformación anatómica de los genitales, sobre todo en hembras, que presentan una gran proximidad con la región perineal, haciendo que las bacterias de la microbiota intestinal se desplacen a otras zonas y causen cuadros infecciosos. Por ello, existiría una mayor prevalencia de infecciones urinarias.

En el presente estudio, de los 41 aislados de *Klebsiella* sp. provenientes de perros y gatos con cuadros clínicos, se tiene un 12.2% (5/41) de presencia de los genes de carbapenemasas (bla_{KPC}, bla_{NDM} y $bla_{\text{OXA-48}}$). Este hallazgo resulta muy similar a lo obtenido por Lechinski (2019), quien encontró una presencia del 12.3% (8/65) en genes de carbapenemasas (bla_{NDM} y $bla_{\text{OXA-48}}$). Esta similitud se debería a que la propagación de EPC suele ser rápida, representa un grave problema en la salud pública y es de distribución mundial (Girlich *et al*., 2007).

La detección por PCR del gen $bla_{\text{OXA-48}}$ fue del 9.8% (4/41) de las *Klebsiella* sp. aisladas de perros y gatos con cuadros clínicos, lo cual resulta ser ligeramente superior al resultado reportado por Lechinski (2019) en Brasil, donde se detectó molecularmente un 7.7% (5/65) de este gen. Esta similitud podría explicarse porque actualmente las enterobacterias productoras de carbapenemasas se vienen expandiendo mundialmente por su fácil transmisión a través de plásmidos en américa latina (Vera *et al*., 2017). En países europeos como España, la carbapenemasas tipo OXA-48 es la más frecuente a diferencia de otros países en donde prevalece la enzima KPC, tal como lo demuestra Zboromyrska y colaboradores (2019).

En la publicación de Stolle y colaboradores (2013) muestrearon animales provenientes de una clínica veterinaria logrando aislar 136 *Klebsiella* spp. y 1175 *E.coli,* de las cuales detectaron fenotípicamente la carbapenemasa tipo OXA-48 en un 3.7% (5/136) y 0.3% (3/1175) respectivamente. Dicha detección fenotípica fue a través del método de Hodge modificado, el cual muestra una sensibilidad menor en comparación a una prueba PCR y, por consiguiente, podría ser el motivo por el cual en el presente estudio se detectó significativamente superior

(9.8%) y porque epidemiológicamente en los últimos años la expansión del gen *bla*$_{\text{OXA-48}}$ se ha incrementado considerablemente (Lechinski, 2019).

El 2016 González y colaboradores, realizaron un estudio en España, en donde recabaron 160 hisopados rectales de perros sanos provenientes de un hospital veterinario, de los cuales hallaron 2 cepas de *Klebsiella* spp. y 1 *Enterobacter*. De los 3 aislados bacterianos, se logró detectar por PCR un solo gen *bla*$_{\text{OXA-48}}$ en una de las cepas de *Klebsiella* sp. Es fundamental recordar que en España en los últimos años los casos por EPC en humanos se han incrementado considerablemente y la carbapenemasa con mayor prevalencia en dicho país es la OXA-48 y es probable la alta frecuencia de estas enzimas no solo en humanos, sino también en animales de compañía., por lo que la diferencia encontrada con el presente estudio (9.8%) podría deberse a la gran distribución del gen *bla*$_{\text{OXA-48}}$ en Europa, sobre todo en España (González *et al*., 2016).

Un estudio realizado por Liu y colaboradores (2016) en Estados Unidos evidenció la presencia del gen *bla*$_{\text{OXA-48}}$ en cepas de *E. coli* proveniente de perros y gatos, donde detectaron una presencia del 0.5% (13/2443) del gen *bla*$_{\text{OXA-48}}$. Este reporte muestra un porcentaje significativamente inferior al encontrado en el presente estudio (9.8%), lo cual podría deberse a que a pesar de que *E.coli* es una enterobacteria, el gen *bla*$_{\text{OXA-48}}$ se encuentra más distribuido en cepas de *Klebsiella pneumoniae* en comparación a las *E.coli*, y lo confirman Gurung y colaboradores (2020) cuando en aislados de un hospital de Nepal, encuentran al gen *bla*$_{\text{OXA-48}}$ en un 33.3% y 66.7% provenientes de cepas de *E.coli* y *Klebsiella pneumoniae* respectivamente.

En una clínica veterinaria de Egipto según lo informado por Algammal y colaboradores (2022), se obtuvieron 80 muestras fecales provenientes de perros con diarreas de tipo hemorrágicas, logrando aislarse 19 cepas de *E.coli* de los cuales dos de ellas poseían genes de carbapenemasas como el *bla*$_{\text{KPC}}$, lo que representa un 10.5% (2/19). Estos resultados difieren con lo hallado en el presente trabajo (2,4%), y esta diferencia podría explicarse debido a la variación geográfica, el diferente tiempo y espacio en donde se realizó el estudio, como también las diferentes costumbres y condiciones higiénicas de cada país. Las condiciones geográficas juegan un rol importante ya que se han visto ciertos linajes bacterianos con resistencia antimicrobiana hallados en aguas residuales y propios de una determinada región, por lo que desempeña un papel fundamental (Carvalho *et al*., 2021).

Liu y colaboradores (2022) recolectaron cepas del hospital universitario de China, en donde lograron aislar 294 cepas de *K. pneumoniae*. De las cepas aisladas, 40 presentaron el gen *bla*$_{\text{KPC}}$, representando un 13.6% (40/294). Este porcentaje difiere del encontrado en el presente trabajo el

cual encuentra solo un 2.4% y la diferencia podría deberse a que en la investigación de Liu y colaboradores evaluaron cepas provenientes de humanos y las de este trabajo son cepas que proveían de perros y gatos con cuadros clínicos, además, el uso de carbapenémicos en medicina veterinaria es limitado en comparación a medicina humana que son pacientes que tienden a adquirir la resistencia antimicrobiana en nosocomios y existe una mayor presión antibiótica.

La aparición de aislamientos con presencia de uno o más genes de carbapenemasas en un grave problema debido a las limitaciones para el tratamiento que presentará, además de representar una gran amenaza en la salud pública. Liu y colaboradores (2022) recolectaron 117 cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de hospitales de China, hallando un 20.5% (24/117) de aislados coproductores de genes de carbapenemasas (bla_{KPC} y bla_{NDM}). Estos resultados difieren del presente estudio (2.4%) en donde se encontró una cepa de *Klebsiella* con dos genes de carbapenemasas (bla_{KPC} y bla_{NDM}) proveniente de un gato. Esta diferencia podría deberse a los pocos reportes que existen donde evalúen la presencia de estos genes de resistencia en perros y gatos, por lo que el presente estudio contribuirá con dicha información. Además, con los hallazgos encontrados podemos ratificar que los genes de carbapenemasas se van distribuyendo y ya no solo en humanos, sino también en otras especies y lo demuestra Yousfi y colaboradores (2018) al encontrar carbapenemasas en aves, animales de compañía y caballos. La presencia de genes de carbapenemasas en animales de compañía es alarmante por el gran potencial de transmisión de especies bacterianas a causa del estrecho contacto que existe entre los propietarios y sus respectivas mascotas.

Zhao y colaboradores (2021) recolectaron 1331 muestras provenientes de cerdos, de las cuales 19 cepas de *K. pneumoniae* presentaron el gen bla_{NDM}, por lo que representa un 1.4% (19/1331), resultado similar al evidenciado en el presente estudio (2.4%) a pesar de ser diferentes especies. Esta semejanza podría deberse a que muchas veces existen deficiencias sanitarias durante la crianza de cerdos, y podría ocasionar que esto a su vez haya provocado que cepas humanas lograran estar presentes en estos animales, provocando su diseminación (Graham *et al*., 2019).

La rápida aparición de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CRE, por sus siglas en inglés) en todo el mundo son motivo de preocupación. Además, otra enzima que se ha detectado es IMP. Si bien existen diversas variante de IMP en diferentes especies de bacterias gramnegativas, en países como Estados Unidos se ha detectado poca frecuencia y su detección generalmente es en especies como *Pseudomonas*. Y tal como lo describen algunos autores, existe una baja o nula presencia del gen bla_{IMP} en bacterias como *Klebsiella* sp., lo cual se corroboraría

con el resultado de 0 en los 41 aislados de *Klebsiella* sp. evaluadas en el presente estudio (Angles *et al*., 2020, Medina *et al*., 2022).

Los genes asociados a carbapenemasas reportadas en este estudio, $bla_{\text{OXA-48}}$, bla_{KPC} y bla_{NDM} representan a todas las clases de enzimas según la clasificación de Ambler (1980) por lo que corrobora que en el Perú se pueden hallar a todas estas clases de carbapenemasas. La presencia de estas enzimas sugiere que se han extendido a lo largo de América Latina, logrando ser endémico en países aledaños como Brasil, México, etc. Por ello, la implementación de métodos de control para evitar la diseminación de estas enzimas es fundamental, entre ellos existen medidas como regímenes para la administración de antibióticos, lavado de manos, entre otros (Vargas *et al*., 2017).

En el presente trabajo se identificaron genes de carbapenemasas, sumado al incremento de resistencias antimicrobianas en todo el mundo y a la gran problemática que conllevan las resistencias, es fundamental que todas las áreas implicadas trabajen conjuntamente para dentro del enfoque de una salud o "One Health" (Salud humana, animal y ambiental), con el objetivo de minimizar el impacto que genera la diseminación de bacterias resistentes a múltiples fármacos y frenar la aparición de más cepas con las mismas características, como también fomentar la concientización de la población para evitar casos de subdosificaciones, automedicación, entre otras actividades que generen esta resistencia (Van, *et al*., 2017).

Es fundamental considerar que en diversos grupos de enterobacterias se han visto casos de transmisión de cepas bacterianas entre humanos y animales, y lo afirma Li *et al*., 2019 cuando logra confirmar la transferencia directa de EPC entre animales y humanos a través de un contacto estrecho en aldeas de China. Ellos realizaron un análisis filogenético y detectaron que los cepas de *E.coli* con gen NDM de aldeanos, compartían una similitud mayor al 99% con las cepas de *E.coli* aisladas animales de corral, traspatio, entre otros (Li *et al*., 2019). Por ello, es fundamental que mediante el enfoque de una salud se puedan realizar estudios paralelos entre personales de granja – animales, propietarios – mascotas y personal de plantas de sacrificio – animales, con la finalidad de tener una mejor visualización acerca de la situación en nuestro país.

En la presente investigación, se logró evaluar y detectar por primera vez en el Perú bacterias productoras de carbapenemasas provenientes de perros y gatos con cuadros clínicos en aislados del género *Klebsiella*. Los resultados obtenidos confirman la preocupación a nivel mundial de las enfermedades infecciosas a causa de bacterias multirresistentes productoras de carbapenemasas, por lo que conlleva a un gran riesgo en la salud animal y pública (OMS, 2017). Además, el desarrollo de esta investigación realizada fue incentivada por las pocas publicaciones acerca de esta bacteria en hospederos como los animales de compañía, los cuales tienen un estrecho contacto con sus propietarios y tienen la capacidad de albergar bacterias productoras de carbapenemasas de riesgo mundial.

El protocolo de PCR utilizado en el presente estudio, utilizó primers diseñados por Watahiki y colaboradores (2020), quien estandarizó un protocolo de PCR, cuyo protocolo fue diseñado para la detección de carbapenemasas de *Enterobacteriaceae*, mostrando un 100% de sensibilidad y especificidad. Además, según Kaase y colaboradores (2012) mencionan que la evaluación genética es más confiable en comparación a una prueba fenotípica, en donde muchas veces demuestra baja sensibilidad y especificidad para algunas carbapenemasas, dificultando y/o enmascarando su detección oportuna. Si bien el trabajo realizado por Watahiki fue a través de un PCR múltiple, en la presente investigación se prefirió trabajar cada gen de manera independiente, ya que el gen bla_{KPC}, a diferencia del resto, solía amplificar zonas inespecíficas que dificultaban la visualización de los productos. Esto podría deberse al diseño de los cebadores, ya que cuando poseen baja estabilidad puede ocasionar que dos regiones se plieguen sobre sí misma, formando estructuras secundarias, o cuando la temperatura de hibridación es muy baja, se da la formación de regiones no específicas ya que los primers o cebadores se unirán en forma inespecífica (Benchling, 2022).

La presente investigación presentó como limitante el no secuenciamiento de los productos positivos del PCR realizado, ya que es una herramienta esencial para la confirmación de la presencia o ausencia de genes de carbapenemasas porque permite evaluar la secuencia en mención, sin embargo para el uso de controles positivos, se hizo uso de aislados que pasaron previamente por la prueba de inmunocromatografía Coris BioConcept y posterior a ello se le realizó el PCR correspondiente, lográndose visualizar el producto indicado en la electroforesis en gel de agarosa. Además, la entidad que nos brindó los aislados con los controles positivos realizaron el secuenciamiento respectivo en donde se comprobó la presencia de dichos genes de carbapenemasas, pero esa información no pudo ser compartida con nosotros, ya que pertenece a otro proyecto en curso y que hasta el momento no ha sido publicado.

VI. CONCLUSIONES

- ✓ Cinco aislados de *Klebsiella* spp. procedentes de perros y gatos con cuadros clínicos poseen genes de carbapenemasas, siendo el $bla_{\text{OXA-48}}$ el de mayor presencia.

- ✓ En la presente investigación, no se detectó molecularmente al gen $bla_{\text{IMP-1}}$ y $bla_{\text{IMP-2}}$ en aislados de *Klebsiella* spp. procedentes de perros y gatos con cuadros clínicos.

VII. RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda realizar más estudios moleculares acerca de la presencia de genes de carbapenemasas en distintas especies bacterianas y animales, con la finalidad de tener un panorama más global acerca de estas enzimas tan perjudiciales para la salud humana y animal.

- ✓ Además, se sugiere realizar la prueba de sensibilidad antimicrobiana siempre que se desee prescribir un antimicrobiano, para así evitar posteriores cuadros de resistencia antimicrobiana y por consecuencia fallas en el tratamiento terapéutico.

- ✓ La rápida propagación de bacterias productoras de carbapenemasas en perros y gatos con cuadros clínicos significa una grave problema de salud pública. Es por ello, que se debe de trabajar en el enfoque de una sola salud que beneficiará a la salud humana, animal y al medio ambiente.

- ✓ De los hallazgos obtenidos en la presente investigación, se rescata la gran necesidad del conocimiento del uso racional de los antimicrobianos, además que a diferencia de medicina humana, para la adquisición de antibióticos no es necesario una receta veterinaria, ocasionando un uso inadecuado o uso no racional, y más aún si no va de la mano una prueba de sensibilidad ¨in vitro¨ hace que aumente la aparición de bacterias resistentes.

VIII. LITERATURA CITADA

1. ***Adler K, Radeloff, I, Stephan B, Greife H, Hellmann K. 2007***. Bacteriological and virological status in upper respiratory tract infections of cats (cat common cold complex). Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift, 120(3-4): 120–125.

2. ***Algammal A, El Tarabili R, Alfifi K, Otaibi A, Abo M, El Maghraby M, Mahmud A*.** **2022.** Virulence determinant and antimicrobial resistance traits of Emerging MDR Shiga toxigenic *E. coli* in diarrheic dogs. AMB Express 12(34). doi: https://doi.org/10.1186/s13568-022-01371-4

3. ***Almaraz G, Cabedo C, Calvelo R, Gómez F. 1996.*** Valoración de los inhibidores de las betalactamasas. [Internet], [01 abril de 2023]. Disponible en: https://www.sefh.es/revistas/vol20/n4/225_235.PDF

4. ***Angles E, Huaringa J, Sacsaquispe R, Pampa L. 2020.*** Panorama de las cerbapenemasas en Perú. Rev Panam Salud Pública 44. doi: 10.26633/RPSP.2020.61

5. ***Ashurst JV, Dawson A. 2022***. Klebsiella Pneumoniae. In: StatPearls. Treasure Island (FL). [Internet], [20 enero de 2021]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/

6. ***Astocondor L. 2018.*** Betalactamasas: La evolución del problema. Revista Peruana de Investigación en Salud 2(2): 42-49. doi: https://doi.org/10.35839/repis.2.2.224

7. ***Bachman M, Oyler J, Burns S, Caza M, Lepine F, Dozois C, Weiser J. 2011***. Klebsiella pneumoniae Yersiniabactin Promotes Respiratory Tract Infection through Evasion of Lipocalin 2. Infection and immunity 79(8): 3309-3316. doi:10.1128/IAI.05114-11

8. ***Barcelona L, Marín, M, Stamboulian Daniel. 2008.*** Betalactámicos con inhibidores de betalactamasas: Amoxicilina-sulbactam. [Internet], [09 abril de 2023]. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802008000100012&lng=es&tlng=es.

9. ***Benchling . 2022.*** How to design primers. [Internet], [10 noviembre 2023]. Disponible en: https://www.benchling.com/primer-design-for-pcr#chapter4

10. ***Bergey D, Harrison F, Breed R, Hammer B. 1925.*** Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa, 2ª ed., Williams & Wilkins Co, Baltimore: 462 p.

11. ***Berrazeg M, Diene S, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D, Rolain J. 2014.*** New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps 19(20). doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.20.20809

12. ***Blanco P, Hernando A, Reales J, Corona F, Lira F, Alcalde M, Bernardini A, Sánchez M, Martínez J. 2016.*** Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. Microorganisms 4(1): 1-5. doi: 10.3390/microorganismos4010014

13. ***Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. 2005.*** Rapid spread of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. Arch Intern Med 165(12): 1430-1435. doi: 10.1001/archinte.165.12.1430.

14. ***Brenner D, Steigerwalt A, Fanning G. 1972.*** Differentiation of Enterobacter aerogenes from klebsiellae by deoxyribonucleic acid reassociation. Int. J. Syst. Bacteriol 22(4): 193-200. doi:10.1099/00207713-22-4-193

15. ***Brisse S, Issenhuth-Jeanjean S, Grimont P. 2004.*** Molecular serotyping of *Klebsiella* Species Isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. J. Clinical microbiology 42(8): 3388-3398. doi: 10.1128/JCM.42.8.3388-3398.2004

16. ***Brisse S, Grimont F, Grimont P. 2006.*** The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3ª ed. Nueva York, Estados Unidos: Springer.159-196.

17. ***Bueno J. 2015.*** Epidemiología molecular de enterobacterias productoras de carbapenemasas. Tesis de maestría de medicina. Zaragoza. Universidad de Zaragoza. 7-12p

18. ***Bush K, Bradford P. 2016.*** β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harbor perspectives in medicine 6(8). doi: 10.1101/cshperspect.a025247.

19. ***Bush K, Jacoby G. 2010.*** Updated Functional Classification of β-Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 54(3): 969. doi: 10.1128/AAC.01009-09.

20. ***Cannon R, Lamping E, Holmes R, Niimi K, Baret P, Keniya M, Tanabe K, Niimi M, Goffeau A, Monk B. 2009.*** Efflux mediated antifungal drug resistance. Clinical micribiology reviews 22(2): 291-321. doi: 10.1128/CMR.00051-08

21. ***Carrillo R, Días M, Peña C. 2013***. Síndrome de absceso hepático secundario a Klebsiella pneumoniae hipermucoviscosa. Una entidad emergente. Med Int Mex 29(5): 533-536.

22. ***Carvalho I, Cunha R, Martins C, Martínez S, Safia N, Pimenta P, Pereira A, Ramos S, Sadi M, Martins A, Façanha J, Fazle R, cápita R, Calleja C, Enes M, Igrejas G, Torres C, Poeta P. 2021.*** Antimicrobial Resistance Genes and Diversity of Clones among Faecal ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy and Sick Dogs Living in Portugal. Antibiotics 10(8): 1-15. doi: https://doi.org/10.3390/antibiotics10081013

23. ***Chander Y, Ramakhishnan M, Jindal N, Hanson K, Goyal S. 2011.*** Differentiation of Klebsiella pneumoniae and K. oxytoca by Multiplex Polymerase Chain Reaction. Journal of Applied Research in Veterinary Medicine 9(2): 138-142.

24. ***Christaki E, Marcou M, Tofarides A. 2020.*** Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. J Mol Evol 88: 26-40. doi: https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3

25. ***Cisneros F, Parsons L. 2007***. Antimicrobials: classifications and uses in critical care. Critical care nursing clinics of North America 19(1): 43-51. doi: 10.1016/j.ccell.2006.10.004.

26. ***Codjoe F, Donkor E. 2017.*** Carbapenem resistance: A review. Medical sciences 6(1): 2-3. doi: 10.3390/medsci6010001

27. ***Cubero M. 2015.*** Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*. Tesis de doctorado de la Facultad de Medicina. Barcelona. Universidad de Barcelona. 44p

28. ***Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. 2001.*** Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. International journal of s ystematic and evolutionary microbiology 51 (3): 925-932. doi: 10.1099/00207713-51-3-925.

29. ***Donlan R. 2002.*** Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging infectious diseases 8(9): 881-890. doi: 10.3201/eid0809.020063.

30. ***Donlan R, Costerton J. 2002.*** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical microbiology reviews 15(2): 167-193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193.2002.

31. ***Edwards P, Ewing W. 1972.*** Identification of enterobacteriaceae. 4ª ed. New York, Estados Unidos: Elsevier: 362 p.

32. ***Fernández A, García C, Saéz J, Valdezate S. 2010.*** Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. [Internet], [30 junio 2022]. Disponible en: https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf

33. ***Fernández F, López J, Ponce L, Machado C. 2003.*** Resistencia bacteriana. Revista Cubana de Medicina Militar 32(1).

34. ***Fernández R, 2018.*** Estudio epidemiológico sobre resistencias antimicrobianas en el diagnóstico laboratorial de animales de compañía. [Internet], [30 junio 2022]. Disponible en: https://ddd.uab.cat/pub/trerecpro/2017/hdl_2072_359363/TFM_rfernandezsanchez.pdf

35. ***Fleming A. 1929.*** On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of H. influenza. Br J Exp Pathol 10(3): 226-236.

36. ***Gastelo R, Días R, Maguiña C. 2016.*** Carbapenemasas en bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas en servicios críticos del Hospital Regional Lambayeque, diciembre 2014 - julio 2015. Acta Médica Perú 33(3): 183-188.

37. ***Giono S, Santos J, Rayo O, Torres F, Alcántar M. 2020.*** Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. Gaceta médica de México 156(2): 172-180. doi: 10.24875/GMM.20005624.

38. ***Girlich D, Poirel L, Carattoli A, Kempf I, Lartigue M, Bertini A, Nordmann P. 2007.*** Extended-Spectrum β-Lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* Isolates from Healthy Poultry in France. Appl Environ Microbiol 73(14): 4681-4685. doi: 10.1128/AEM.02491-06

39. ***González A, Oteo J, Asenjo A, Bautista V, Fuentes E, Alós J. 2016.*** Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Companion Dogs in Madrid, Spain. Antimicrob. Agents Chemother. doi: 10.1128/AAC.02383-15

40. ***Gopi P, Bonomo R. 2013.*** "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. Front Microbiol 14(4). doi: 0.3389/fmicb.2013.00048.

41. ***Graham D, Bergeron G, Bourassa M, Dickson J, Gomes F, Howe A, Kahn L, Morley P, Scott M, Simjee S, Cantante R, Smith T, Storrs C, Wittum T. 2019.*** Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems. Annals of the New York academy of sciences 1441(1): 17-30. doi: https://doi.org/10.1111/nyas.14036

42. ***Gurung S, Kafle S, Dhungel B, Adhikari C, Thapa U, Adhikari B Raj M, Raj K, Ghimire P. 2020.*** Detection of OXA-48 Gene in Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Urine Samples. Infection and drug resistance 13: 2311-2321. doi: 10.2147/idr.s259967

43. ***Harada S, Aoki K, Yamamoto S, Ishii Y, Sekiya N, Kurai H, Furukawa K. Doi A, Tochitani K, Kubo K, Yamaguchi Y, Narita M, Kamiyama S, Suzuki J, Fukuchi T, Gu Y, Okinaka K, Shiiki S, Hayakawa K, Tachikawa N, Kasahara K, Nakamura T, Yokota K, Komatsu M, Takamiya M, Tateda K, Doi Y. 2019.*** Clinical and Molecular Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Causing Bloodstream Infections in Japan: Occurrence of Hypervirulent Infections in Health Care. Journal of clinical microbiology 57(11). doi: 10.1128/jcm.01206-19

44. ***Hawkey P. 2003.*** Mechanisms of quinolone action and microbial response. The journal of antimicrobial chemotheraphy 51(1): 29-35. doi: 10.1093/jac/dkg207

45. ***Holden V, Breen P, Houle S, Dozois C, Bachman M. 2016***. *Klebsiella pneumoniae* siderophores induce inflammation, bacterial dissemination, and HIF-1α stabilization during pneumonia. American society for microbiology 7(5). doi: 10.1128/mbio.01397-16

46. ***Hormaeche E, Edwards P. 1958***. Observations on the genus *Aerobacter* with a description of two species. International journal of systematic and evolutionary microbiology 8(2): 111-115. doi: 10.1099/0096266X-8-2-111

47. ***Hormaeche E, Edwards P. 1960.*** A proposed genus Enterobacter. International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy 10(2): 71-74. doi: 10.1099/0096266X-10-2-71

48. ***Jagnow J, Clegg S. 2003.*** Klebsiella pneumoniae MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. Microbiology 149(9): 2397-2405. doi: 10.1099/mic.0.26434-0

49. ***Jain K, Radsak K, Mannheim W. 1974.*** Differentiation of the Oxytocum group from Klebsiella by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization. International Journal of Systematic 24(4): 402-407. doi: 10.1099/00207713-24-4-402

50. ***Johnson J, Clabots C, Kuskowski M. 2008.*** Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household member. J Clin Microbiol 46(12): 4078-4082. doi: 10.1128/JCM.00980-08

51. ***Jordán C, Morales – Cauti S, Rubio A, Barrios-Arpi M, Villacaqui-Ayllón E. 2019.*** Risk factors for the presentation of bacteriuria in cats with lower urinary tract disease: a retrospective analysis of 102 cases (2008 – 2015). Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 30(4): 1770-1778. doi: http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i4.17158

52. ***Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermann S. 2012.*** Detection of Carbapenemases in *Enterobacteriaceae* by a Commercial Multiplex PCR. J Clin Microbio 50(9): 3115-3118. doi: 10.1128/JCM.00991-12

53. ***Koneman E. 2008.*** Introducción a la microbiología. [Internet], [01 abril de 2023]. Disponible en: file:///C:/Users/ecruz/Downloads/dokumen.tips_koneman-diagnostico-microbiologico-2008pdf.pdf

54. ***Kumar A, Schweizer H. 2005.*** Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. Advanced drug delivery reviews 57(10): 1486-1513. doi: 10.1016/j.addr.2005.04.004

55. ***Kuo Y, Jung L, Fon Y, Chang F, Han H, Leung S, Feng C. 2010.*** Revisiting the Importance of Virulence Determinant *magA* and Its Surrounding Genes in *Klebsiella*

pneumoniae Causing Pyogenic Liver Abscesses: Exact Role in Serotype K1 Capsule Formation. The Journal of Infectious Diseases 201(8):1259-1267. doi: 10.1086/606010

56. ***Li L, Ge H, Gu D, Meng H, Li Y, Jia M, Zheng C, Zhou X. 2018.*** The role of two-component regulatory system in β-lactam antibiotics resistance. Microbiological Research 215: 126-129. doi: 10.1016/j.micres.2018.07.005

57. ***Li J, Bi Z, Ma S, Chen B, Cai C, e J, Schwarz S, Sun C, Chou Y, Yin J, Hulth A, Wang Y, Shen Z, Wang S, Ming C, Nilsson L, Walsh T, Borjesson S, Shen J, Yang Q. 2019.*** Inter-host Transmission of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* among Humans and Backyard Animals. Environmental Health Perspectives 127(10). doi: https://doi.org/10.1289/EHP5251

58. ***Ling G, Norris C, Franti, C, Eisele, P, Johnson D, Ruby A, Jang S. 2001.*** Interrelations of organism prevalence, specimen collection method, and host age, sex, and breed among 8,354 canine urinary tract infections (1969-1995). Journal of veterinary internal medicine 15(4), 341–347.

59. ***Liu X, Thungrat K, Boothe D. 2016.*** Occurrence of OXA-48 Carbapenemase and Other β-Lactamase Genes in ESBL-Producing Multidrug Resistant Escherichia coli from Dogs and Cats in the United States, 2009–2013. Front Microbiol (7). doi: 10.3389/fmicb.2016.01057

60. ***Liu X, Zhang J, Li Y, Shen Q, Jiang Y, Zhao K, Nie Z, Xu X, Zhou Y. 2019.*** Diversity and frequency of resistance and virulence genes in bla_{KPC} and bla_{NDM} co-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from China. Infection and drug resistance 12: 2819-2826. doi: https://doi.org/10.2147/IDR.S214960

61. ***Liu Y, Cheng D, Lin C. 1986.*** Klebsiella pneumoniae liver abscess associated with septic endophthalmitis. Archives of Internal Medicine 146(10): 1913-1916. doi: 10.1001/archinte.1986.00360220057011.

62. ***Lopardo H. 2020.*** Antibióticos: Clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia. 1era Edición. La Plata, Argentina. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). 20-25p.

63. ***López J Echeverri L. 2010.*** K. pneumoniae: ¿la nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal 23(2): 157-165. [Internet], [08 de junio 2023]. Disponible en: https://www.redalyc.org/pdf/1805/180519015007.pdf

64. ***Maeda T. 2017.*** Hypermucoviscosity Klebsiella pneumonia (hvKP). [Internet], [20 julio 2022]. Disponible en: https://matsushita-er.blogspot.com/2017/06/hypermucoviscosity-klebsiella.html

65. ***Máttar S, Martínez P. 2007.*** Emergencia de la resistencia antibiótica debida a las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE): detección, impacto clínico y epidemiología. [Internet], [20 diciembre 2022]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v11n1/v11n1a05.pdf

66. ***Marqués C, Belas A, Franco A, Aboim C, Gama L, Pomba C. 2018.*** Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16-year retrospective study. J Antimicrob Chemother 73(2): 337-384. doi: 10.1093/jac/dkx401

67. ***Marques C, Belas A, Aboim C, Cavaco P, Trigueiro G, Telo L, Pomba C. 2019.*** Evidence of Sharing of *Klebsiella pneumoniae* Strains between Healthy Companion Animals and Cohabiting Humans. Journal of Clinical Microbiology 57(6). doi: https://doi.org/10.1128/jcm.01537-18

68. ***Martínez J. 2014.*** General principles of antibiotic resistance in bacteria. Drug discovery today: Technologies 11: 33-39. doi: 10.1016/j.ddtec.2014.02.001

69. ***Martínez L, Calvo J. 2010.*** Development of resistances to antibiotic drugs: causes, consequences and importance to the public health system. Enferm Infecc Microbiol Clin 4: 4-9. doi: 10.1016/S0213-005X(10)70035-5

70. ***Medina M, Venkatesh A, Riveros M, Cuicapuza D, Salmón G, Mausezahl D, Hartinger S. 2022.*** Whole-Genome Characterisation of ESBL-Producing *E. coli* Isolated from Drinking Water and Dog Faeces from Rural Andean Households in Peru. Antibiotics 11(5): 692: doi: https://doi.org/10.3390/antibiotics11050692

71. ***Meletis G. 2016.*** Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. The Adv Infect Dis 3(1): 15-21. doi: 10.1177/2049936115621709

72. ***McCuistion L, Vuljoin K, Winton M, Yeager J. 2020.*** Pharmacology: A Patient-Centered Nursing Process Approach. 10th Edition. USA. Elsevier.

73. ***McDonnekk A, Silverman R, Pincombe M, Yadav P, Guzman J. 2021.*** As Antimicrobial Resistance Advances, We Need Action to Stop a Predictable Catastrophe. [Internet], [23 de marzo 2023]. Disponible en: https://www.cgdev.org/blog/antimicrobial-resistance-advances-we-need-action-stop-predictable-catastrophe

74. ***MDM (Modelos de Diagnóstico Microbiológico). 2021.*** Series de identificación bioquímica. [Internet], [6 de julio 2023]. Disponible en: https://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2021/03/IS-24-SERIES-DE-IDENTIFICACION-BIOQUIMICA.pdf

75. ***Mycrobiologynote. 2023.*** Prueba de Rojo de Metilo y Vogues Proskauer: principio, resultado. [Internet], [6 de julio 2023]. Disponible en: https://microbiologynote.com/es/methyl-red-and-voges-proskauer-test-principle-result/

76. ***Morejón M. 2013.*** Betalactamasas de espectro extendido. 2013. Revista Cubana de Medicina 52(4). [Internet], [6 de marzo 2023]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232013000400006

77. ***Moreno C, González R, Beltrán C. 2009.*** Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello 69(2). doi: 10.4067/s0718-48162009000200014.

78. ***Moreno K. 2013.*** Carbapenémicos: Tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. Revisa médica de Costa Rica y Centroamérica LXX 608: 599-605.

79. ***Naziri Z, Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Shojaee A. 2016.*** DNA fingerprinting approaches to trace *Escherichia coli* sharing between dogs and owners. J Appl Microbiol (120): 460-468. doi: 10.1111/jam.13003

80. ***Nordmann P, Cuzón G, Naas T. 2009.*** The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis 9(4): 228-236. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70054-4

81. ***Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011.*** Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 17(10): 1791-1798. doi: 10.3201/eid1710.110655

82. ***Ochoa A, García M, Cienfuegos A, Vásquez-Jaramillo. 2022.*** Isolation of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae strains producing extended-spectrum β-lactamases from dog urine of the Metropolitan Area of the Aburrá Valley (Antioquia, Colombia). Red Med Vet Zoot 69(3): 245-258. doi: https://doi.org/10.15446/rfmvz.v69n3.103805

83. ***[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2016***. Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. [Internet], [6 de agosto 2022]. Disponible en: https://www.who.int/es/publications/i/item/9789241509763

84. ***[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2017***. La OMS publica la lista de las bacterias que las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. [Internet], [14 diciembre 2021]. Disponible en: https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed#:~:text=Entre%20tales%20bacterias%20se%20incluyen,la%20corriente%20sangu%C3%ADnea%20y%20neumon%C3%ADas.

85. ***[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2020***. Resistencia a los antimicrobianos. [Internet], [10 mayo 2022]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance

86. ***[OMS] Organización Mundial de la Salud. 2021.*** Resistencia a los antimicrobianos. [Internet], [20 julio 2023]. Disponible en: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20son%20los%20antimicrobianos%3F,los%20animales%20y%20las%20plantas

87. ***OPS/OMS. 2021.*** Emergencia e incremento de nuevas combinaciones de carbapenemasas en Enterobacterales en Latinoamérica y el Caribe. [Internet], [20 agosto 2023]. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/55319/EpiUpdate22oct2021_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y

88. ***Ørskov, I. 1974.*** The genus *Klebsiella*. In Buchanan and Gibbons. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed, The Williams & Wilkins Co. Baltimore. 324 p.

89. ***Ørskov, I, Ørskov, F. 1977.*** Special O:K:H serotypes among enterotoxigenicE. colistrains from diarrhea in adults and children. Med Microbiol Immunol 163(2): 99-110. doi: 10.1007/bf02121825

90. ***Pagano M, Gauverau K. 2008.*** Principios de bioestadística. Cengage Learning 2ª ed., 506p.

91. ***Paulin G, Screetatsan S, Singer R, Isaacson R, Reneau J, Beg R, Foster D. 2008.*** Molecular subtyping of mastitis-associated Klebsiella pneumoniae isolates shows high levels of diversity within and between dairy herds. Journal of dairy science, 91(2): 554–563. doi: 10.3168/jds.2007-0479

92. ***Pérez D. 1998.*** Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Inf Ter Sis Nac Salud 22(3): 57-67. [Internet], [28 junio 2022]. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf

93. ***Pérez H, Robles A. 2013.*** Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Revista Médica MD 4(3): 188-190

94. ***Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. 2010.*** Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. International journal of Medical Microbiology 300(6): 371-379. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.04.005

95. ***Piperaki E, Syrogiannopoulos G, Tzouvelekis L, Daikos G. 2017.*** Klebsiella pneumoniae: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. Pediatr Infect Dis J 36(10): 1oo2-1005. doi: 10.1097/INF.0000000000001675

96. ***Podschun R, Sahly H. 1991.*** Hemagglutinins of Klebsiella pneumoniae and K. oxytoca isolated from different sources. *Zentralblatt fur Hygiene und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine 191*(1): 46–52.

97. ***Podschun R, Ullmann U. 1992.*** Klebsiella capsular type k7 in relation to toxicity, sesceptibility to phagocytosis and resistance to serum. J. Med. Microbiol 36(4): 250-254. doi: 10.1099/00222615-36-4-250

98. ***Podschun R, Ullmann U. 1998.*** *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clinical microbiology reviews 11(4): 589-603: doi: 10.1128/cmr.11.4.589

99. ***Poirel L, Potrón A, Nordmann P. 2012.*** OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. J Antimicrob Chemother 67(7): 1597-1606. doi: 10.1093/jac/dks121

100. ***Pomba C, Rantala M, Greco C, Baptiste K, Catry B, Van Duijkeren E, Mateus A, Moreno M, Pyorala S, Ruzauskas M, Sanders P, Teale C,***

Threlfall E, Kunsagi Z, Torren-Edo J, Jukes H, Torneke C. 2017. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 72(4): 957-968. doi: https://doi.org/10.1093/jac/dkw481

101. ***Queenan A, Bush K. 2007.*** Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 20(3): 440-458. doi: 10.1128/CMR.00001-07.

102. ***Raisman J. 2005***. La pared bacteriana. Hipertextos del área de la biología. [Internet], [10 mayo 2023]. Disponible en: http://www.biologia.edu.ar/bacterias/micro4.htm

103. ***Rey M. 2019.*** Klebsiella pneumoniae Klebsiella pneumoniae (Schroeter, 1886) Trevisan, 1887. [Internet], [10 abril 2023]. Disponible en: https://www.gbif.org/occurrence/2270823001

104. ***Reygaert W. 2018.*** An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS microbiology 4(3). doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482

105. ***Roberts D, McClain H, Hansen D, Currín P, Howerth E. 2000.*** An outbreak of Klebsiella pneumoniae infection in dogs with severe enteritis and septicemia. Journal of veterinary diagnostic investigation 12(2): 168–173. doi: 10.1177/104063870001200215.

106. ***Roberts G, Goodman N, Heifets L, Larsh H, Lindner T, McClatchy J, McGinnis M, Siddiqi S, Wright P. 1983.*** Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis from acid-fast smear-positive specimens. Journal of clinical microbiology 18(3): 689-696. doi: 10.1128/jcm.18.3.689-696.1983.

107. ***Rodrigo C. 2010.*** Use of antibiotics in the paediatric population. Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica. 28(5): 310-320. doi: 10.1016/j.eimc.2010.03.001

108. ***Rodríguez P, Arenas R. 2018.*** Hans Christian Gram and his staining. Dermatología cosmética, médica y quirúrgica 16(2): 166-167. [Internet], [10 abril 2023]. Disponible en: https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf

109. ***Rubin J, Pitout, J. 2014***. Extended-spectrum β-lactamase, carbapenemase and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals. Veterinary microbiology, 170(1-2): 10–18. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.017

110. ***Sandle T. 2004.*** Gram's Stain: History and Explanation of the Fundamental Technique of Determinative Bacteriology. IST Science and Technology Journal. 54(1): 3-4

111. ***Seija V, Vignoli R. 2008.*** Principales grupos de antibióticos. 3ra ed. Montevideo, Uruguay: Departamento de Bacteriología y Virología. 637p.

112. ***Schwalbe R, Steele L, Goodwin A. 2007***. Antimicrobial susceptibility testing protocols. 1era ed. London, New York. 14-15p.

113. ***Shon A, Bajwa R, Russo T. 2013.*** Hypervirulent (hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae: a new and dangerous breed. Virulence, 4(2): 107–118. doi:10.4161/viru.22718

114. ***Silva I, Guedes M, Rocha M, Medeiros C, Oliveira L, Moreira O, Teixeira M. 2005.*** Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. Arq Bras Med. Vet Zootec 57(1): 136-139. doi: 10.1590/s0102-09352005000100019

115. ***Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Scheufen S, Hassdenteufel E, Guenther S, Bethe A, Pfeifer Y, Ewers C. 2013.*** Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in dogs. J antimicrobe chemother 68(12): 2802-2808. doi: 10.1093/jac/dkt259

116. ***Struve C, Bojer M., Krogfelt K. 2009.*** Identification of a conserved chromosomal region encoding Klebsiella pneumoniae type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and immunity 77*(11): 5016–5024. doi: 10.1128/iai.00585-09

117. ***Suárez C, Gudiol F. 2009.*** Antibióticos betalactámicos. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica 27(2): 116-129. doi: 10.1016/j.eimc.2008.12.001

118. ***Tártara S. 2017.*** Patógenos emergentes: tercera parte. Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasas (KPN-KPC). [Internet], [12 marzo de 2022]. Disponible en: https://www.revistarenal.org.ar/index.php/rndt/article/view/168

119. ***Umar U, Ibrahim M, Abubakar S, Muhammad I. 2019.*** A review on β-lactam antibiotic drug resistance. Moj drug des develop 3(2): 52-58.

120. ***Van S, Deborggraeve S, Jacobs J. 2017.*** Why the antibiotic resistance crisis requires a One Health approach. The Lancet Infectious Diseases 18(2): 132-134. Doi: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30704-1

121. ***Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas M. 2017.*** The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. Expert Rev Anti Infect Ther 15(3): 277-297. doi: 10.1080/14787210.2017.1268918

122. ***Vera A, Barría C, Carrasco S, Lima C, Aguayo A, Domínguez M, Bello H, González G. 2017.*** KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. Revista chilena de infectología 34(5): 476-484. Doi: https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476

123. ***Wainwright M. 1986.*** CG Paine and the earliest surviving clinical records of penicillin therapy. Medical History 30(1): 42-56. doi: 10.1017/s0025727300045026

124. ***Wareth G, Neubauer H. 2021.*** The Animal-foods-environment interface of *Klebsiella pneumoniae* in Germany: an observational study on pathogenicity,

resistance development and the current situation. Vet Res 52(16). doi: 10.1186/s13567-020-00875-w

125. **W*atahiki M, Kawahara R, Suzuki M, Aoki M, Uchida K, Matsumoto Y, Kumagai Y, Noda M, Masuda K, Fukuda C, Harada S, Senba K, Suzuki M Matsui M, Suzuki S, Shibayama K, Shinomiya H. 2020.*** Single-Tube Multiplex Polymerase Chain Reaction for the Detection of Genes Encoding Enterobacteriaceae Carbapenemase. Jpn J Infect Dis 73(2): 11-172. doi: 10.7883/yoken.JJID.2019.041

126. ***Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. 1991.*** Transferable imipenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 35(1): 147-151. Doi: 10.1128/aac.35.1.147

127. ***Wesevich, A, Sutton G, Ruffin F, Park L, Fouts D, Fowler V, Thaden J. 2020.*** Newly Named *Klebsiella aerogenes* (formerly *Enterobacter aerogenes*) Is Associated with Poor Clinical Outcomes Relative to Other *Enterobacter* Species in Patients with Bloodstream Infection. J. Clinical microbiology 58(9): 1-21. doi: 10.1128/jcm.00582-20

128. ***Woodward B, Carter M, Seidler R. 1979.*** Most nonclinical Klebsiella Strains are not K. pneumoniae sensu stricto. Current Microbiology 2(3): 181-185. doi: 10.1007/bf02605879

129. ***Wyres K, Holt K. 2016.*** Klebsiella pneumoniae Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. Trends Microbiol 24(12): 944-956. doi: 10.1016/j.tim.2016.09.007

130. ***Wyres K, Lam M, Holt K. 2020.*** Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol 18: 344-359. doi:10.1038/s41579-019-0315-1

131. ***Yousfi M, Touati A, Mairi A, Brasme L, Gharout -Sait A, Guillard T, De Champs C. 2016.*** Emergence of Carbapenemase-Producing Escherichia coli Isolated from Companion Animals in Algeria. Microbial drug resistance 22(4)1-5. doi: 10.1089/mdr.2015.0196

132. ***Yousfi M, Touati A, Muggeo A, Mira B, Asma B, Brasme L, Guillard, Champs C. 2018.*** Clonal dissemination of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* isolates from companion animals in Algeria. Journal of global antimicrobial (12): 187-191 doi: https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.007

133. ***Yu W, Ko W, Cheng K, Lee H, Ke D, Lee C, Fung C, Chuang Y. 2006.*** Association between *rmpA* and *magA* Genes and Clinical Syndromes Caused by Klebsiella pneumoniae in Taiwan. Clinical Infectious Diseases 42(10): 1351-1358. doi: 10.1086/503420

134. ***Yucailla D. 2019.*** Evaluación del uso de antibióticos betalactámicos en el servicio de hospitalización del hospital General Andino en el periodo enero 2017 a julio de 2018. Tesis de Bioquímico Farmacéutico. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 13-37p

135. ***Zhao W, Li S, Schwarzb S, Lia A, Yao H, Dang Du X. 2021.*** Detection of a NDM-5-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 (CG258) high-risk clone in swine. Veterinary Microbiology 262: 1-5. doi: 10.1016/j.vetmic.2021.109218

IX. ANEXOS

ANEXO 1. Reactivación y extracción de ADN

- ✓ Procedimiento

ETAPA I: Reactivación de cepas de *Klebsiella* spp.

1. Hacer uso de un tubo con TSB (2mL) y dejarlos a temperatura ambiente hasta que se descongele.

2. Utilizar un tip estéril para tomar una muestra del vial, previa homogenización de este. Se puede extraer 100uL con el tip o una gota aproximadamente con un ansa circular. Dejar incubar mínimo 3 horas a 37°C hasta observar la turbidez del medio.

3. Sembrar en agar McConkey una gota del medio turbio a 37°C por 24 horas en la estufa.

4. Llevar el frasco de LB y viales a la cámara de flujo, para colocar en cada vial (2mL) 1500µL de caldo LB.

5. Inocular la colonia deseada y dejar incubar a 37°C durante 3 horas. Se recomienda que la colonia a seleccionar sea joven para realizar una mejor extracción de ADN.

ETAPA II: Preparación del Buffer de Lisis

1. Realizar la preparación de EDTA al 0.5 M y Tris-Cl a 1M
   Importante: Recordar que el EDTA solo logra solubilizarse a un pH de 8.0
2. Para lograr una preparación de 20 mL de buffer se debe agregar lo siguiente:
   a. 0,4 mL de 1M Tris-Cl (concentración final de 20mM Tris-Cl en el buffer)
   b. 0,08 mL de 0,5 M EDTA (concentración final de 2mM EDTA)
   c. 0,24 mL de Triton X-100 (concentración final de 1.2% Triton X-100 en el uffer)
3. Antes de utilizar la alícuota del buffer, inmediatamente debe agregarse la lisozima, proporcional a número de muestras que se desean extraer.

ETAPA III: Purificación de ADN genómico de bacterias Gramnegrativas

1. Recolectar células bacterianas en un microvial de 1.5-2ml por centrifugación a 5000 X gravedades (5000 x g) durante 10 minutos con la finalidad de obtener un sedimento en la parte inferior. Eliminar el sobrenadante y asegurarnos de dejar solo el pellet.

2. Agregar el Buffer de lisis con las lisozimas manteniendo una concentración de 40mg/mL en otro vial y homogenizarlo en el vortex.

3. En 180 µl de Buffer de lisis más lisozimas resuspender el pellet obtenido inicialmente e incubar dicha mezcla por 1 hora a 50°C en el bloque de calor.

4. Agregar 200 µl de Solución de lisis y 20 µl de Proteinasa K a la mezcla obtenida. Homogenizar bien con ayuda del vortex hasta observar una solución uniforme.

5. Nuevamente colocar la mezcla en el bloque de calor por 1 hora a 65°C, homogenizando en vortex cada 15 minutos, con la finalidad de lisar totalmente las células.

6. Agregar 20 µl de la solución de RNasa A a la mezcla y homogenizar en el vortex y dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

7. Agregar 400 µl de etanol al 50% y homogenizar en el vortex hasta que se observe uniforme.

8. Traspasar la mezcla lisada a una columna de kit de Purificación de ADN GenJET Genomic, previamente insertada en un tubo colector. Centrifugar toda la columna y el tubo colector por 1 minuto a 6000 X gravedades (6000 x g) y posterior a ello descartar el tubo colector que posee un filtro en el interior. Colocar la columna en un nuevo tubo colector de 2mL

9. Agregar 500 µl de solución de lavado o Buffer de lavado I (Wash Buffer I con añadición de etanol). Centrifugar a 8000 X gravedades por 1 minuto y descartar el contenido del tubo colector para colocar uno nuevo.

10. Agregar 500 µl de solución de lavado o Buffer de lavado II (Wash Buffer II con añadición de etanol) y centrifugar a una velocidad ≥ 1200 X gravedades (13500 gravedades) por 3 minutos. Descartar el tubo colector y repetir el proceso de centrifugación colocando otro tubo colector, pero ahora solo por 1-2 minutos.

11. Pasar la columna a un vial nuevo y estéril, para luego agregar 100 µl de Buffer de elusión, con la finalidad de que el ADN se resuspenda del filtro. Esperar de 2-3 minutos a temperatura ambiente.

12. Colocar el nuevo vial a la centrífuga a 8000 X gravedades por 1 minuto y descartar la columna de purificación. El sobrenadante es el ADN purificado que debe ser almacenado a -20°C.

ANEXO 2. Presencia de genes de carbapenemasas en las cepas de *Klebsiella* spp.

N°	CÓDIGO	GÉNERO	ESPECIE	CARBAPENEMASAS			
				KPC	NDM	OXA	IMP 1 Y 2
1	E41	*K. pneumoniae*	Gato	-	-	-	-
2	E119	*K. pneumoniae*	Gato	-	-	-	-
3	E120	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-
4	E121	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
5	E122	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-
6	E123	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
7	E127	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
8	E129	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
9	E132	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
10	E135	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-
11	E136	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
12	E137	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	+	-
13	E140	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-
14	E167	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
15	E168	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-
16	E169	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	+	-
17	E170	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
18	E171	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	+	-
19	E172	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
20	E175	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-
21	E193	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-
22	E199	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
23	E200	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
24	E201	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
25	E202	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
26	E203	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
27	E204	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-

28	**E205**	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-
29	**E206**	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-
30	**E207**	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
31	**E208**	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-
32	**E209**	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
33	**E211**	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
34	**E212**	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-
35	**E213**	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
36	**E214**	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
37	**E216**	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
38	**E217**	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	-	-
39	**E219**	*Klebsiella* spp.	Perro	-	-	-	-
40	**E220**	*K. pneumoniae*	Perro	-	-	+	-
41	**E244**	*K. pneumoniae*	Gato	+	+	-	-

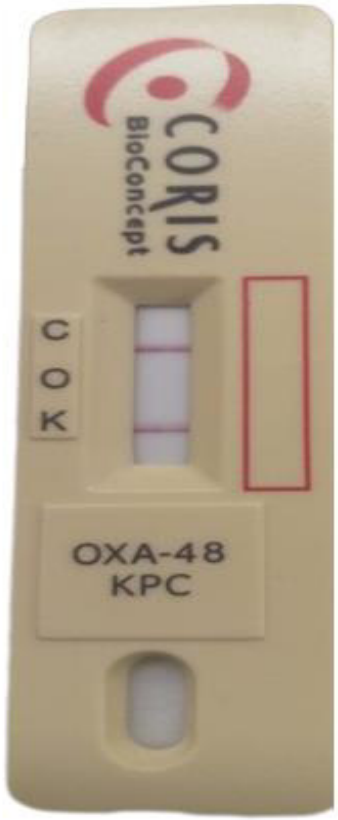
ANEXO 3: Cuadros clínicos por *Klebsiella* sp. en perros y gatos

CÓDIGO	ESPECIE	PATOLOGÍA	GENES DETECTADOS	TIPO DE MUESTRA	EDAD
E137	Perro	Infección urinaria	$bla_{\text{OXA-48}}$	Orina	11 años
E169	Perro	Cuadro de otitis	$bla_{\text{OXA-48}}$	Hisopado de oídos	7 años
E171	Perro	Dermatitis	$bla_{\text{OXA-48}}$	Hisopado de piel	2.5 años
E220	Perro	Infección urinaria	$bla_{\text{OXA-48}}$	Orina	5 años
E244	Gato	Absceso	bla_{NDM} *y* bla_{KPC}	Efusión	3 años

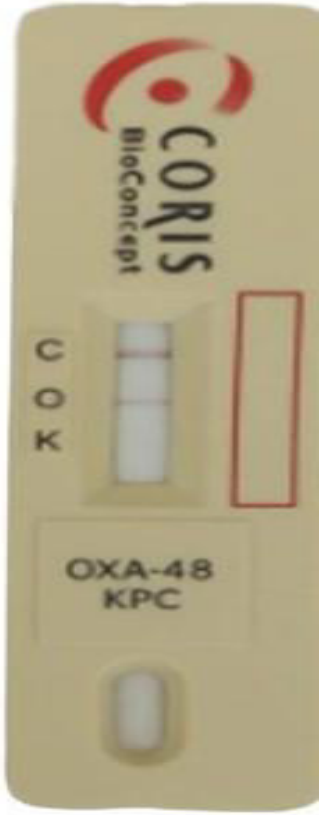
ANEXO 4: Clasificación de enfermedades por especie

ENFERMEDADES	INECCIÓN URINARIA	OTITIS	PROBLEMAS RESPIRATORIOS	ABSCESO	PROBLEMAS DE PIEL	NO DETERMINADO	TOTAL
PERROS	15	2	2	1	4	14	38
GATOS	1	0	0	1	1	0	3
N° DE PACIENTES TOTALES	16	2	2	2	5	14	41
PORCENTAJE	39% (16/41)	4.9% (2/41)	4.9% (2/41)	4.9% (2/41)	12.2 (5/41)	34.1% (14/41)	100%

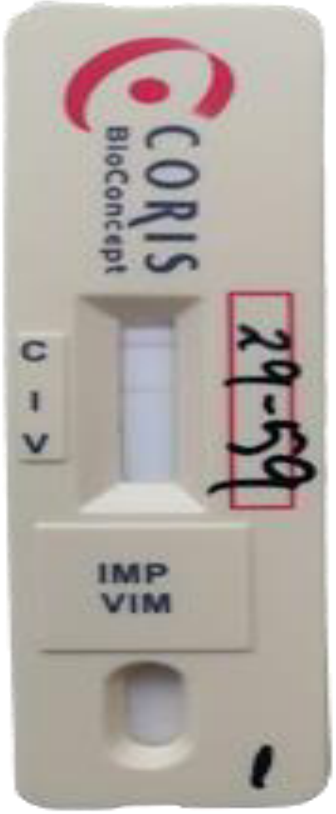
ANEXO 5: Pruebas de inmunocromatografía para detección de carbapenemasas



Enzima KPC



Enzima OXA-48



Enzima IMP-1 e IMP-2



Enzima NDM