

Sistema CRISPR/Cas como marcador poblacional en *Klebsiella pneumoniae*: Un enfoque  
bioinformático

Anderson Orlando Bonilla Ayala

Trabajo de Grado para Optar el Título de Biólogo

Director

José Arturo Gutiérrez Triana

PhD en Ciencias Naturales

Codirector

Mauricio Corredor Rodríguez

PhD en Genética Molecular

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2026

### **Dedicatoria**

Este trabajo de grado se lo dedico a mis padres, quienes sin su apoyo esto no sería posible.

### **Agradecimientos**

Expreso mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que contribuyeron, de una u otra manera, al desarrollo y culminación de este proyecto.

A mi familia, seres queridos y amigos, por su apoyo incondicional, compañía y confianza a lo largo de este proceso. Su respaldo constante ha sido fundamental tanto para mi crecimiento personal como profesional. Sin su presencia y motivación, este logro no habría sido posible.

A mis directores, José Arturo Gutiérrez Triana y Mauricio Corredor Rodríguez, por su orientación, dedicación, paciencia y valiosos aportes durante el desarrollo de esta investigación. Sus conocimientos y acompañamiento fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

Al profesor Juan David Gutiérrez Torres, por su disposición para brindar asesoría en la elaboración de los códigos empleados en este estudio, contribuyendo significativamente al desarrollo de los análisis realizados.

A la Escuela de Biología y a la Universidad Industrial de Santander, por proporcionar la formación académica, los recursos y el entorno necesarios para mi desarrollo profesional y para la ejecución de este proyecto.

Finalmente, a mis compañeros de carrera que hicieron de mi vida universitaria una experiencia inolvidable.

A todos ustedes, mi más profundo agradecimiento.

## Tabla de Contenido

|                                                                       | Pág. |
|-----------------------------------------------------------------------|------|
| Introducción .....                                                    | 10   |
| 1. Objetivos .....                                                    | 13   |
| 1.1 Objetivo General .....                                            | 13   |
| 1.2 Objetivos Específicos.....                                        | 13   |
| 2. Cuerpo del Trabajo .....                                           | 14   |
| 2.1 Marco Referencial.....                                            | 14   |
| 2.1.1 Historia de la resistencia a antibióticos.....                  | 14   |
| 2.1.2 Métodos de resistencia bacteriana .....                         | 15   |
| 2.1.3 Sistema CRISPR/Cas .....                                        | 16   |
| 2.1.4 Aspectos generales de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....        | 17   |
| 2.2 Método. ....                                                      | 19   |
| 2.2.1 Descarga de secuencias y elaboración de base de datos .....     | 19   |
| 2.2.2 Descarga y organización de espaciadores y arreglos CRISPR ..... | 20   |
| 2.2.3 Modelado de machine learning. ....                              | 21   |
| 2.3 Resultados. ....                                                  | 22   |
| 2.4. Discusión.....                                                   | 35   |
| 3. Conclusiones .....                                                 | 39   |
| 4. Recomendaciones .....                                              | 40   |
| Referencias Bibliográficas .....                                      | 41   |
| Apéndices                                                             |      |

**Lista de Tablas****Pág.**

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1 <i>Listado de cepas con sistema CRISPR e información asociada</i> ..... | 25 |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                            | <b>Pág.</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Figura 1 <i>Información sobre resistencia a antibióticos y procedencia de las cepas</i> .....                                                              | 23          |
| Figura 2 <i>Distribución de presencia y número de arreglos CRISPR por tipo de resistencia.</i> .....                                                       | 23          |
| Figura 3 <i>Distribución de número de plásmidos y genes de resistencia antimicrobiana según el tipo de resistencia a antibióticos.</i> .....               | 24          |
| Figura 4 <i>Distribución de número de plásmidos, genes de resistencia antimicrobiana y espaciadores según el tipo de resistencia a antibióticos.</i> ..... | 31          |
| Figura 5 <i>Frecuencia de espaciadores según la resistencia a antibióticos.</i> .....                                                                      | 32          |
| Figura 6 <i>Organización de patrones de espaciadores dentro de los arreglos CRISPR.</i> .....                                                              | 33          |
| Figura 7 <i>Capacidad de predicción de resistencia a antibióticos de espaciadores y patrones CRISPR.</i> .....                                             | 35          |

### **Lista de Apéndices**

Los apéndices están adjuntos y puede visualizarlos en la base de datos de la biblioteca UIS.

Apéndice A. *Información genómica y fenotípica de las cepas de Klebsiella pneumoniae incluidas en el estudio.*

Apéndice B. *Compilación de espaciadores CRISPR identificados en las cepas analizadas.*

Apéndice C. *Código para el procesamiento y análisis comparativo de espaciadores CRISPR.*

Apéndice D. *Código para la identificación y organización de patrones CRISPR.*

Apéndice E. *Código para el análisis de asociación entre características CRISPR y resistencia a antibióticos mediante Machine Learning.*

Apéndice F. *Base de datos con información de espaciadores CRISPR empleada en el análisis de procesamiento y análisis comparativo de espaciadores.*

Apéndice G. *Base de datos con información de espaciadores y patrones CRISPR empleada en el análisis de Machine Learning.*

Apéndice H. *Listado de cepas totales e información asociada.*

Apéndice I. *Organización de patrones de espaciadores dentro de los arreglos CRISPR.*

## Resumen

**Título:** Sistema CRISPR/Cas como marcador poblacional en *Klebsiella pneumoniae*: Un enfoque bioinformático\*

**Autor:** Anderson Orlando Bonilla Ayala\*\*

**Palabras Clave:** CRISPR, marcador poblacional, resistencia a antibióticos, machine learning

### Descripción:

El sistema CRISPR/Cas es un mecanismo de inmunidad adaptativa presente en procariotas que almacena fragmentos de material genético exógeno adquiridos durante infecciones previas. Debido a esta capacidad, los arreglos CRISPR constituyen registros dinámicos de la interacción bacteriana con elementos genéticos móviles, lo que plantea su potencial uso como marcador poblacional y epidemiológico, así como su posible relación con la resistencia a antibióticos.

En este estudio se analizaron genomas completos de *K. pneumoniae* disponibles en la base de datos BV-BRC. Los arreglos CRISPR fueron identificados mediante CRISPRCasFinder y posteriormente procesados mediante scripts desarrollados en Python. Además, se implementaron modelos de machine learning para evaluar la asociación entre espaciadores, patrones CRISPR y resistencia antimicrobiana.

Menos de la mitad de las cepas analizadas presentó sistema CRISPR/Cas. Entre ellas se observaron perfiles susceptibles, resistentes y multirresistentes a antibióticos, lo que indica que la presencia del sistema no excluye la coexistencia con la resistencia antimicrobiana. Asimismo, se identificaron 664 espaciadores y 157 patrones de espaciadores, evidenciando una alta variabilidad en la composición de los arreglos CRISPR. Tres cepas aisladas de distintas regiones geográficas en diferentes años comparten arreglos altamente similares, lo que sugiere una posible historia evolutiva compartida del locus CRISPR. Los análisis exploratorios con modelos predictivos mostraron que determinados espaciadores y patrones CRISPR contribuyeron a la clasificación de cepas resistentes dentro del conjunto de los datos analizados.

En conjunto, los resultados sugieren que el sistema CRISPR/Cas podría presentar cierta flexibilidad frente a la adquisición de material genético externo, particularmente en cepas resistentes. Asimismo, la conservación de arreglos CRISPR altamente similares entre cepas aisladas en diferentes contextos geográficos respalda su potencial utilidad como marcador poblacional y epidemiológico. Finalmente, la asociación observada entre determinados espaciadores y la predicción de resistencia antimicrobiana indica una relación más compleja entre CRISPR/Cas y resistencia a antibióticos de lo planteado tradicionalmente.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: José Arturo Gutiérrez Triana. PhD en Ciencias Naturales. Codirector: Mauricio Corredor Rodríguez. PhD en Genética Molecular.

## Abstract

**Title:** CRISPR/Cas system as a population marker in *Klebsiella pneumoniae*: A bioinformatic approach\*

**Author:** Anderson Orlando Bonilla Ayala\*\*

**Key Words:** CRISPR, population marker, antibiotic resistance, machine learning.

### Description:

The CRISPR/Cas system is an adaptive immune mechanism found in prokaryotes that stores fragments of exogenous genetic material acquired during previous infections. Due to this capability, CRISPR arrays constitute dynamic records of bacterial interactions with mobile genetic elements, highlighting their potential use as population and epidemiological markers, as well as their possible relationship with antibiotic resistance.

In this study, complete *Klebsiella pneumoniae* genomes available in the BV-BRC database were analyzed. CRISPR arrays were identified using CRISPRCasFinder and subsequently processed through Python scripts. In addition, machine learning models were implemented to evaluate the association between CRISPR spacers, spacer patterns, and antimicrobial resistance.

Less than half of the analyzed strains carried a CRISPR/Cas system. Among these, susceptible, resistant, and multidrug-resistant phenotypes were identified, indicating that the presence of the system does not preclude the coexistence of antimicrobial resistance. Furthermore, 664 spacers and 157 spacer patterns were identified, revealing a high degree of variability in CRISPR array composition. Three strains isolated from different geographic regions and years shared highly similar CRISPR arrays, suggesting a possible shared evolutionary history of the CRISPR locus. Exploratory analyses using predictive models showed that specific spacers and CRISPR patterns contributed to the classification of resistant strains within the analyzed dataset.

Overall, the results suggest that the CRISPR/Cas system may exhibit a certain degree of flexibility toward the acquisition of exogenous genetic material, particularly in resistant strains. Likewise, the conservation of highly similar CRISPR arrays among strains isolated from different geographic contexts supports their potential utility as population and epidemiological markers. Finally, the observed association between specific spacers and the prediction of antimicrobial resistance indicates a more complex relationship between CRISPR/Cas and antibiotic resistance than has traditionally been proposed.

---

\* Degree Work

\*\* Faculty of Science. School of Biology. Director: José Arturo Gutiérrez Triana. PhD in Natural Sciences. Codirector: Mauricio Corredor Rodríguez. PhD in Molecular Genetics.

## Introducción

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno documentado desde los primeros años de la introducción de la penicilina en el tratamiento clínico (Rammelkamp & Maxon, 1942; McKee & Houck, 1943). Sin embargo, en las últimas décadas, se ha convertido en un problema de salud pública global debido a la proliferación de bacterias resistentes, dificultando la eficacia de los tratamientos antimicrobianos y el control de las enfermedades infecciosas (Miller and Arias, 2024; OMS, 2024). En el año 2019 se estimaron 1.27 millones de muertes directamente atribuibles a bacterias resistentes a antimicrobianos y 4.95 millones de muertes asociadas a este fenómeno (Murray et al., 2022). Esta situación ha motivado la implementación de estrategias internacionales de vigilancia, prevención y control, incluidas las directrices establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016; OMS, 2024). En Colombia, el Instituto Nacional de Salud ha reportado frecuencias elevadas de resistencia en infecciones nosocomiales causadas por bacterias Gram negativas, particularmente en Unidades de Cuidados Intensivos y servicios de hospitalización (INS, 2019).

La resistencia bacteriana puede originarse por mutaciones cromosómicas o mediante la adquisición de genes de resistencia por transferencia horizontal de genes, mediada por elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones e integrones (Urban-Chmiel et al., 2022). Estos determinantes genéticos favorecen la aparición de mecanismos que reducen la eficacia de los antibióticos, entre ellos la inactivación enzimática del fármaco, la modificación de sus sitios diana, la disminución de la permeabilidad celular y la expulsión activa mediante bombas de eflujo (De Oliveira et al., 2020). La expansión de estos determinantes genéticos se ha visto favorecida por el uso extendido e indiscriminado de estos fármacos, tanto en contextos clínicos como en actividades agropecuarias (Col & Connor, 1987; DuPont & Steele, 1987; Holt et al.,

2015). Esta presión selectiva ha contribuido a la selección y diseminación de cepas resistentes en múltiples entornos ecológicos, particularmente en entornos hospitalarios, donde la presión selectiva favorece la acumulación de determinantes genéticos de resistencia y la expansión de cepas multirresistentes (Holt et al., 2015).

En respuesta a esta problemática, se han propuesto alternativas terapéuticas complementarias, entre ellas el uso de bacteriófagos. Sin embargo, la eficacia de estos virus puede verse condicionada por la presencia de los sistemas de inmunidad innata y adquirida de la bacteria. En particular, el sistema CRISPR/Cas es un mecanismo de inmunidad adaptativa bacteriana capaz de reconocer y degradar material genético exógeno, como ADN o ARN viral y, en algunos casos, plásmidos (Barrangou et al., 2007; Garneau et al., 2010). Durante este proceso, las bacterias incorporan en su genoma nuevos fragmentos de ADN derivados de estos elementos genéticos que han infectado previamente a la célula, denominados espaciadores. Por lo tanto, los arreglos CRISPR constituyen registros dinámicos de infecciones pasadas, conformados por secuencias altamente variables entre cepas (Jiang et al., 2013). Además de participar en la defensa frente a bacteriófagos, los sistemas CRISPR/Cas pueden interferir en la transferencia horizontal de genes y, en consecuencia, limitar la adquisición de algunos determinantes de resistencia antimicrobiana (Marraffini et al., 2008). A pesar de ello, en entornos sometidos a elevada presión selectiva, algunas bacterias pueden perder, modular o inactivar componentes del sistema CRISPR/Cas para facilitar la incorporación de genes de resistencia (Jiang et al., 2013).

En el contexto actual de la resistencia antimicrobiana, *Klebsiella pneumoniae* representa uno de los patógenos bacterianos de mayor relevancia clínica debido a su elevada capacidad para adquirir y diseminar genes de resistencia y virulencia mediante transferencia horizontal (Holt et al., 2015; Wyres et al., 2020). Esta capacidad favorece su adaptación a ambientes sometidos a

alta presión selectiva, como los entornos hospitalarios, y contribuye a la expansión global de linajes multirresistentes. En este escenarios, la interacción entre elementos genéticos móviles y los sistemas CRISPR/Cas resulta de particular interés, ya que estos últimos no solamente pueden actuar como barreras frente a la incorporación de ADN exógeno (Barrangou et al., 2007) sino que, al mismo tiempo, pueden aportar valiosa información sobre las relaciones evolutivas entre cepas, así como posibles eventos de transmisión y dispersión geográfica gracias a la composición, organización e identidad de los espaciadores en el arreglo CRISPR. Esta diversidad tiene el potencial de ser utilizada como un marcador poblacional o epidemiológico para rastrear la circulación y migración de cepas bacterianas entre distintos ambientes y regiones, fortaleciendo, los estudios filogenómicos y de tipificación molecular.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Caracterizar arreglos CRISPR en *Klebsiella pneumoniae* a partir de genomas reportados, con el fin de evaluar su variabilidad y posible relación con la resistencia a antibióticos y la dinámica epidemiológica de esta especie.

### 1.2 Objetivos Específicos

1. Detectar la presencia o ausencia de loci CRISPR en genomas de *K. pneumoniae*.
2. Clasificar el sistema CRISPR a partir de regiones conservadas y variables, el polimorfismo en longitud y composición de los arreglos CRISPR.
3. Analizar la asociación entre la presencia/ausencia de arreglos CRISPR y los perfiles de resistencia a antibióticos.

## 2. Cuerpo del Trabajo

### 2.1 Marco Referencial

#### 2.1.1 *Historia de la resistencia a antibióticos*

El siglo XX representó un periodo determinante en el desarrollo de estrategias para combatir las infecciones bacterianas, las cuales constituyeron una de las principales causas de mortalidad humana. Entre los primeros avances se encuentra el descubrimiento de los bacteriófagos, virus capaces de lisar bacterias descubiertos en la segunda década del siglo, utilizados inicialmente en el tratamiento de infecciones como la disentería (Compton, 1942). Sin embargo, la introducción de los antibióticos en la década de 1940 reemplazó a la bacteriófagos, transformando radicalmente el manejo clínico de las enfermedades infecciosas, reduciendo la gravedad de numerosas infecciones bacterianas y contribuyendo al aumento de la esperanza de vida.

A pesar de este avance, pocos años después del uso clínico de la penicilina comenzaron a registrarse casos de resistencia antimicrobiana, tanto en experimentos in vitro (McKee & Houck, 1943) como en aislamientos provenientes de pacientes infectados (Rammelkamp & Maxon, 1942). En el entorno hospitalario, la propagación de cepas resistentes ocurrió rápidamente, reportándose brotes con frecuencia (Bondi & Dietz, 1945; Plough, 1945; Barber & Rozwadowska-Dowzenko, 1948). Con el tiempo, este fenómeno se extendió a múltiples grupos bacterianos y se asoció con un incremento en la mortalidad por infecciones hacia finales del siglo XX (Cohen, 1992; Armstrong, 1999). En bacterias de vida libre, la adquisición de resistencia ocurría de forma más lenta debido a la menor presión de selección en ambientes naturales (Holt et al., 2015). No obstante, la producción masiva y el uso indiscriminado de antibióticos (Col & Connor, 1987), junto con el desarrollo de antimicrobianos de amplio espectro y su

implementación en la ganadería (DuPont & Steele, 1987), intensificaron dicha presión selectiva y favorecieron la emergencia de cepas resistentes en diversos ecosistemas. Además de promover la selección de bacterias resistentes, el uso inadecuado de antibióticos altera la microbiota normal, facilitando la colonización e infección por patógenos oportunistas (Chen et al., 2023).

Como consecuencia, la resistencia antimicrobiana se ha consolidado como un problema de salud pública global. Para 2019, se estimaron aproximadamente 1,27 millones de muertes atribuidas directamente a bacterias resistentes y cerca de 4,95 millones de muertes asociadas a estas (Murray et al., 2022). Asimismo, la resistencia a los antibióticos continúa en aumento (OMS, 2025), situación que ha motivado el desarrollo de estrategias internacionales para su vigilancia y control. En este contexto, y en concordancia con las recomendaciones de la Asamblea Mundial de la Salud (OMS, 2016), el gobierno colombiano implementó el Protocolo de Vigilancia de Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en el ámbito hospitalario (INS, 2022), con el propósito de fortalecer el monitoreo epidemiológico de bacterias resistentes en el país.

### ***2.1.2 Métodos de resistencia bacteriana***

La resistencia bacteriana a los antibióticos puede surgir mediante mutaciones cromosómicas o, con mayor frecuencia, a través de la adquisición de genes de resistencia mediados por elementos genéticos móviles, como plásmidos conjugativos, transposones e integrones (Urban-Chmiel et al., 2022; De Oliveira et al., 2020). En consecuencia, el repertorio de determinantes genéticos de resistencia de una cepa no depende exclusivamente de su linaje evolutivo, sino también de las interacciones genéticas establecidas con otras bacterias presentes en el entorno, incluso pertenecientes a diferentes especies o nichos ecológicos (Holt et al., 2015; Wyres and Holt, 2018; Kim and Cha, 2021). Estos determinantes genéticos pueden conferir

diversos mecanismos de resistencia, tales como la producción de enzimas que degradan o inactivan antibióticos, la modificación de los sitios diana bacterianos, la disminución de la permeabilidad celular por alteraciones en porinas, la expulsión activa de antimicrobianos mediante bombas de eflujo y la formación de biopelículas (De Oliveira et al., 2020). La relevancia clínica de estos mecanismos es especialmente evidente en el grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*), conformado por bacterias con alta capacidad de adaptación al entorno hospitalario y el desarrollo de resistencia intrínseca o adquirida, lo que limita considerablemente las opciones terapéuticas disponibles (Miller and Arias, 2024; OMS, 2024).

Ante el incremento de la resistencia antimicrobiana, se han explorado estrategias alternativas o complementarias para el tratamiento de infecciones bacterianas, incluyendo péptidos antimicrobianos, sistemas de liberación de fármacos basados en nanopartículas o liposomas, modificaciones estructurales de antibióticos y el uso terapéutico de bacteriófagos (Sultan et al., 2018). Estos últimos han recuperado interés en los últimos años debido a resultados favorables estudios experimentales y en algunos reportes clínicos, especialmente frente a infecciones causadas por bacterias multirresistentes (Schooley et al., 2017; Leitner et al., 2017).

### **2.1.3 Sistema CRISPR/Cas**

Las secuencias CRISPR corresponden a regiones genómicas presentes en algunos procariotas, conformadas por repeticiones cortas parcialmente conservadas e intercaladas con secuencias variables llamadas espaciadores. Estos espaciadores suelen derivarse de elementos genéticos móviles, como bacteriófagos o plásmidos, con los que la célula o sus ancestros han

tenido contacto previo. En asociación con las proteínas Cas (CRISPR-associated), el sistema CRISPR/Cas puede funcionar como un mecanismo de inmunidad adaptativa capaz de reconocer y degradar material genético exógeno, como ADN o ARN viral y, en algunos casos, secuencias plasmídicas (Barrangou et al., 2007; Garneau et al., 2010). Durante este proceso, nuevos espaciadores pueden incorporarse al arreglo CRISPR, generando una memoria molecular parcial de exposiciones previas a elementos genéticos móviles. Por esta razón, la composición y organización de los espaciadores puede variar considerablemente entre cepas y aportar información tanto de su historia evolutiva como de las interacciones con el entorno genético (Jiang et al., 2013).

Además de conferir resistencia frente a bacteriófagos, algunos sistemas CRISPR/Cas pueden influir en la regulación de factores de virulencia (Wiedenheft y Bondy-Denomy, 2017) y restringir la transferencia horizontal de genes, reduciendo potencialmente la adquisición de determinantes de resistencia antimicrobiana (Marraffini et al., 2008). Sin embargo, en ambientes sometidos a alta presión selectiva, como los entornos hospitalarios, algunas bacterias pueden inactivar o perder componentes del sistema CRISPR/Cas para facilitar la incorporación de genes de resistencia y aumentar su supervivencia (Jiang et al., 2013). Además, la conservación o pérdida de estos sistemas puede depender del balance entre sus beneficios defensivos y sus costos fisiológicos, así como de la diversidad y frecuencia de exposición a fagos y otros elementos móviles en cada nicho ecológico (Díez-Villaseñor et al., 2010).

#### **2.1.4 Aspectos generales de *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* es una bacteria perteneciente a la familia Enterobacteriaceae que puede encontrarse tanto en vida libre, en cuerpos de agua o en el suelo, como asociada a distintos hospederos, entre ellos plantas, animales y seres humanos. En algunas situaciones puede

desempeñar un papel de comensal, patógeno oportunista o patógeno (Wyres and Holt, 2018; Wyres et al., 2020). En el ámbito hospitalario constituye una de las principales causas de infecciones nosocomiales, al provocar neumonía e infecciones en heridas, del torrente sanguíneo y del tracto urinario, las cuales pueden progresar a bacteriemia. Asimismo, en la comunidad también es capaz de ocasionar infecciones graves, entre ellas neumonía, absceso hepático piógeno y meningitis (Holt et al., 2015; Wyres et al., 2020).

Gran parte del fenotipo de resistencia de *K. pneumoniae* se relaciona con la transferencia horizontal de genes más que con mutaciones cromosómicas (Wyres et al., 2020). Este fenómeno es particularmente frecuente en ambientes hospitalarios, donde la exposición continua a antibióticos y antisépticos favorece la acumulación y diseminación de genes de resistencia (Holt et al., 2015). Esta bacteria presenta resistencia intrínseca a algunos betalactámicos y, adicionalmente, puede adquirir genes que confieren resistencia a cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos, considerados antibióticos de última línea terapéutica (De Oliveira et al., 2020; Wyres et al., 2020). Entre sus principales factores de virulencia se encuentran las adhesinas fimbriales, los polisacáridos capsulares y los sideróforos, estos últimos asociados con mayor frecuencia a cepas hipervirulentas adquiridas en la comunidad (Holt et al., 2015; Chen et al., 2023).

En Colombia, en un informe del Instituto Nacional de Salud (2019) se registraron infecciones nosocomiales causadas por cepas de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación presentando frecuencias entre 25,3 % y 34,7 % en adultos hospitalizados en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), y entre 36,3 % y 40,3 % en hospitalización general. En población pediátrica y neonatal también se reportaron porcentajes elevados de resistencia. De

igual manera, se registraron frecuencias importantes de resistencia a carbapenémicos tanto en adultos como en pacientes pediátricos.

En *K. pneumoniae* se han identificado principalmente dos tipos de sistemas CRISPR/Cas. El primero corresponde al tipo I, localizado predominantemente en el cromosoma e integrado por los subtipos I-E, I-E\* e I-F (Shen et al., 2017). El segundo corresponde al tipo IV, menos frecuente y generalmente asociado a plásmidos, los cuales pueden portar genes adicionales relacionados con resistencia y virulencia (Kamruzzaman y Iredell, 2020; Long et al., 2023). Particularmente, el subtipo I-E\* se ha asociado con una mayor susceptibilidad a antibióticos y con un menor número de plásmidos y determinantes de resistencia, lo que sugiere una mayor capacidad para restringir la adquisición de elementos genéticos extracromosomales. En contraste, la relación entre el subtipo I-E y la resistencia antimicrobiana aún no se encuentra completamente esclarecida (Li et al., 2018; Kadkhoda et al., 2024).

## **2.2 Método.**

### **2.2.1 Descarga de secuencias y elaboración de base de datos**

La búsqueda y descarga de genomas de *Klebsiella pneumoniae* se realizó en la base de datos Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (<https://www.bv-brc.org/>; Olson et al., 2023), la cual emplea el algoritmo RAST para la anotación automática de genes funcionales y herramientas de Machine Learning para la predicción de fenotipos de resistencia. Por dicha razón, con el fin de obtener una muestra de cepas con información genómica completa y de alta calidad, se aplicaron los siguientes filtros de búsqueda: Species: *Klebsiella pneumoniae*; Genome Status: Complete; y Genome Quality: Good. Posteriormente, se seleccionaron los primeros 200 resultados obtenidos y, adicionalmente, 66 genomas provenientes de Sudamérica.

A partir de esta información, se elaboró una base de datos en Microsoft Excel para registrar características asociadas a cada cepa, tales como región geográfica, número de plásmidos, tamaño de la secuencia, tipo de resistencia a antibióticos y presencia del sistema CRISPR, entre otras variables (ver apéndice A). Así mismo, se realizaron gráficas con el fin de presentar de forma más asequible la información. La clasificación de los tipos de resistencia se realizó siguiendo los criterios establecidos por Magiorakos et al. (2011) para la definición de cepas multirresistentes.

### ***2.2.2 Descarga y organización de espaciadores y arreglos CRISPR***

La descarga de los espaciadores y arreglos CRISPR de cada cepa se realizó mediante el programa CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>; Couvin et al., 2018), los cuales fueron rotulados según la cepa y el número y origen del arreglo, en el caso de que haya más de un arreglo o que estos estuvieran presentes en plásmidos. Asimismo, en la base de datos previamente descrita se registró información relacionada con la cantidad de espaciadores y los tipos de proteínas cas presentes en cada cepa.

Posteriormente, se desarrollaron scripts en Python para el procesamiento y organización de la información obtenida. En primer lugar, los espaciadores CRISPR se recopilaron en un archivo FASTA (ver apéndice B), del cual, mediante la creación de un algoritmo (ver apéndice C), se extrajeron los espaciadores únicos de cada secuencia. Luego, estos se organizaron de acuerdo con su posición dentro de los respectivos arreglos CRISPR. A partir de esta información, por un lado, se construyó una matriz binaria que indicaba la presencia o ausencia de cada espaciador en las diferentes cepas. Con dicha matriz, se elaboró un diagrama de Venn para visualizar la cantidad de espaciadores compartidos entre los distintos fenotipos de resistencia a antibióticos.

Por otro lado, se desarrolló un algoritmo para identificar espaciadores organizados secuencialmente dentro de los arreglos CRISPR de las cepas analizadas, con el propósito de definir patrones de espaciadores (Ver apéndice D) usando la matriz del apéndice F. Estos patrones pueden estar conformados por varios espaciadores, pero en caso no haber sido posible ligar un espaciador con otro entonces por sí solo conformaría un patrón. Finalmente, se realizaron representaciones gráficas de la organización de estos patrones en los arreglos CRISPR de cada cepa.

### ***2.2.3 Modelado de machine learning.***

Con el objetivo de evaluar la posible asociación entre los espaciadores y/o patrones CRISPR con el fenotipo de resistencia a antibióticos, se implementó un modelo de aprendizaje supervisado basado en XGBoost (Extreme Gradient Boosting) utilizando la matriz del apéndice G. Este modelo permite identificar variables con alta capacidad predictiva y manejar de manera eficiente conjuntos de datos con múltiples características y relaciones no lineales (Ver apéndice E). Debido al reducido número de cepas resistentes con sistema CRISPR presentes en la muestra, la variable de respuesta se reorganizó en dos categorías: resistentes, que incluyó tanto cepas resistentes como multirresistentes, y susceptibles. Los parámetros utilizados fueron los siguientes: objetivo=multi:softmax, número de clases=2, número de estimadores=100, tasa de aprendizaje=0.1, random state=42. Los espaciadores y patrones CRISPR se emplearon como variables predictoras para determinar cuáles de estas características contribuían en mayor medida a la clasificación del fenotipo de resistencia.

Posteriormente, la importancia de las variables se evaluó mediante valores SHAP (SHapley Additive exPlanations), una metodología basada en teoría de juegos que permite cuantificar la contribución individual e interacción entre variables en las predicciones del

modelo. A partir de estos valores, se generaron gráficas para identificar los espaciadores y patrones CRISPR con mayor influencia sobre la predicción de resistencia a antibióticos, así como la dirección y magnitud de su efecto en cada clasificación.

### 2.3 Resultados.

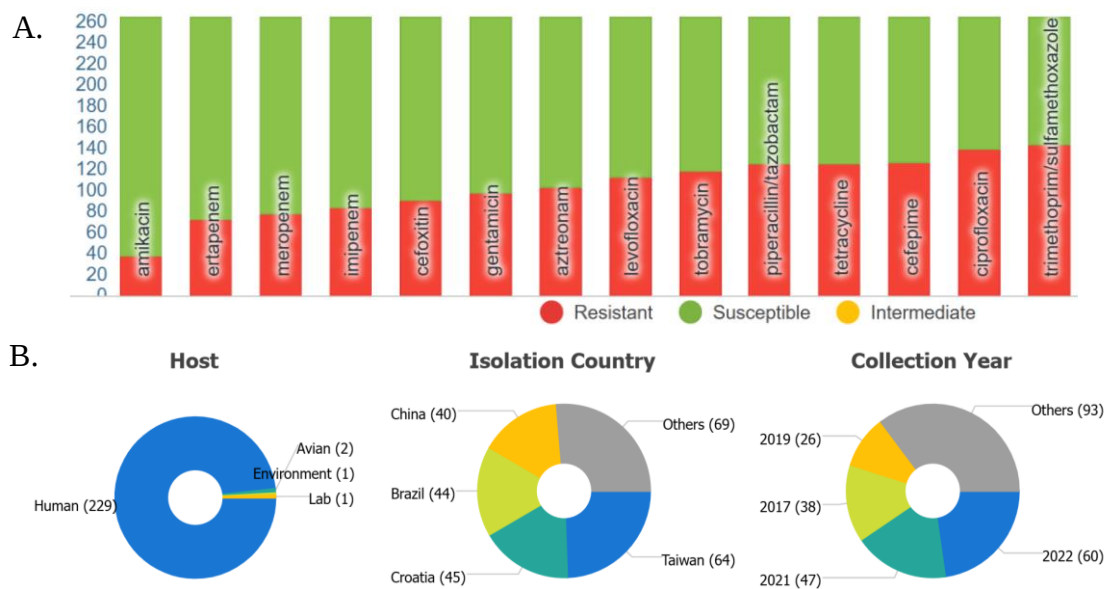
Una vez aplicados los filtros de búsqueda mencionados en la sección de métodos, se obtuvieron 2863 resultados, de los cuales se seleccionaron 266 para la realización de este estudio. Esta colección de genomas completos de alta calidad proviene principalmente de pacientes humanos de Asia y Europa, representados por Taiwán y China, y Croacia, respectivamente. En el caso de Sudamérica, Brasil fue el país con mayor número de cepas reportadas. De forma general, las cepas fueron aisladas con mayor frecuencia en el 2021 y 2022, como se puede ver en la figura 1b.

La clase de antibióticos a la que presentan mayor susceptibilidad fueron los carbapenémicos (67.8%), seguido de las cefamicinas (66.5%) y los aminoglucósidos (61.7%). A pesar de ello, el antibiótico al cual presentan mayor susceptibilidad fue la amikacina (86.1%), un aminoglucósido; seguido de los carbapenémicos ertapenem (73.7%), meropenem (71.4%) e imipenem (69.2%), como se puede observar en la figura 1a. El listado del total de las cepas junto con su información asociada la pueden visualizar en el apéndice H.

En la tabla 1 se registran las cepas con presencia de sistema CRISPR/Cas y sus características asociadas. Del total de las muestras, alrededor del 43,2% ( $n=115/266$ ) presentaron sistema CRISPR, siendo en su totalidad del tipo I-E. De estas cepas, fue más frecuente la presencia de dos arreglos CRISPR ( $n=85$ ) frente a la presencia de un arreglo ( $n=27$ ) y tres arreglos ( $n=2$ ), como se presenta en la figura 2. De estas cepas se obtuvo una colección de 203 arreglos CRISPR, de los cuales, el 94% estaba presente en el cromosoma y el 6% en plásmidos.

**Figura 1**

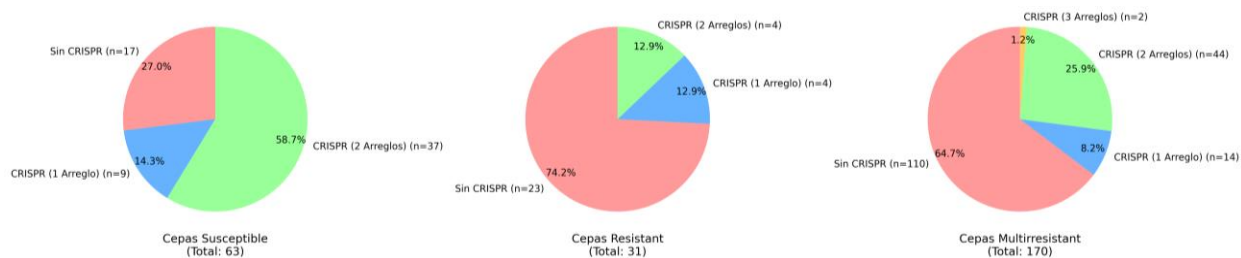
*Información sobre resistencia a antibióticos y procedencia de las cepas*



*Nota:* A. Cantidad de cepas susceptibles y resistentes a los antibióticos testeados. B. Número de cepas de acuerdo al host, país y año en que fueron aisladas.

**Figura 2**

*Distribución de presencia y número de arreglos CRISPR por tipo de resistencia.*



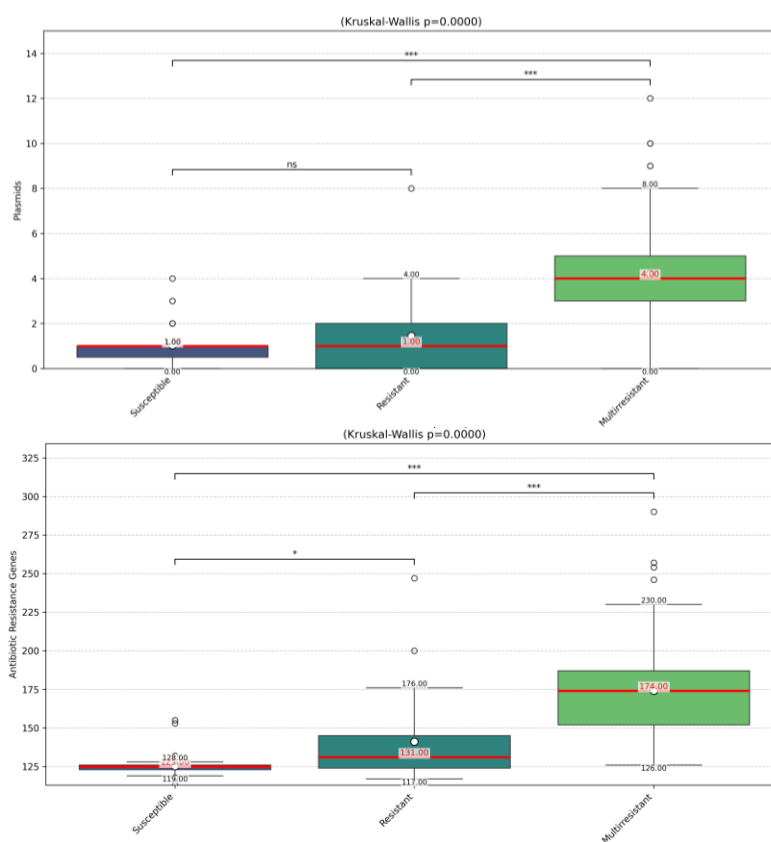
*Nota:* Número de cepas pertenecientes a cada fenotipo de resistencia, presencia de CRISPR, y en dicho caso, cantidad de arreglos que presentan. Rojo: Sin CRISPR. Azul: Con un arreglo CRISPR. Verde: Con dos arreglos CRISPR. Amarillo: Con tres arreglos CRISPR.

En la figura 3 se puede observar que, en el caso de los plásmidos, no hubo diferencias significativas entre cepas susceptibles y resistentes ( $p > 0.05$ ), pero ambos grupos sí tuvieron

diferencias altamente significativas respecto a las cepas multirresistentes ( $p < 0.001$ ). Para el caso del número de genes de resistencia antimicrobiana, entre cepas susceptibles y resistentes hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) y, al igual que en el caso de los plásmidos, ambos grupos tuvieron diferencias altamente significativas respecto a las cepas multirresistentes ( $p < 0.001$ ).

### Figura 3

*Distribución de número de plásmidos y genes de resistencia antimicrobiana según el tipo de resistencia a antibióticos.*



*Nota:* Los puntos blancos dentro de las cajas corresponden a la media y la línea roja horizontal, con su respectivo valor numérico, indica la mediana. Los puntos blancos fuera de los rangos son Outliers. Se calculó el valor P a través del análisis Kruskal-Wallis y Test Post-Hoc de Dunn con corrección de Bonferroni ( $P < 0.05$ ). ns (no significativo,  $p > 0.05$ ), \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

**Tabla 1***Listado de cepas con sistema CRISPR e información asociada.*

| <b>Cepa</b>  | <b>No. de plásmidos</b> | <b>Tamaño del genoma (pb)</b> | <b>Año</b> | <b>País</b> | <b>Grupo geográfico</b> | <b>Fenotipo de resistencia</b> | <b>No. de genes AR</b> | <b>CRISPR</b> | <b>No. de espaciadores</b> |
|--------------|-------------------------|-------------------------------|------------|-------------|-------------------------|--------------------------------|------------------------|---------------|----------------------------|
| 012D         | 0                       | 5454245                       | 2022       | Indonesia   | Asia                    | Multiresistant                 | 159                    | Yes           | 43                         |
| 025D         | 0                       | 5653929                       | 2022       | Indonesia   | Asia                    | Multiresistant                 | 153                    | Yes           | 28                         |
| 032D         | 0                       | 5652734                       | 2022       | Indonesia   | Asia                    | Multiresistant                 | 153                    | Yes           | 28                         |
| 053D         | 0                       | 5502789                       | 2022       | Indonesia   | Asia                    | Multiresistant                 | 159                    | Yes           | 43                         |
| 061D         | 0                       | 5582284                       | 2022       | Indonesia   | Asia                    | Multiresistant                 | 174                    | Yes           | 13                         |
| 063D         | 0                       | 5574291                       | 2022       | Indonesia   | Asia                    | Multiresistant                 | 174                    | Yes           | 13                         |
| 18473        | 7                       | 5830667                       | 2020       | Greece      | Europe                  | Multiresistant                 | 152                    | Yes           | 29                         |
| 18722        | 5                       | 5734603                       | 2021       | Greece      | Europe                  | Multiresistant                 | 204                    | Yes           | 22                         |
| 18926        | 5                       | 5833440                       | 2022       | Greece      | Europe                  | Multiresistant (XDR)           | 230                    | Yes           | 22                         |
| 18937        | 8                       | 5990361                       | 2022       | Greece      | Europe                  | Multiresistant (XDR)           | 219                    | Yes           | 43                         |
| 2020CK-00441 | 2                       | 5573423                       | 2020       | USA         | North America           | Susceptible                    | 124                    | Yes           | 38                         |
| 2024CK-00187 | 1                       | 5560271                       | 2023       | USA         | North America           | Resistant                      | 151                    | Yes           | 76                         |
| 24_5         | 4                       | 5663157                       | 2024       | China       | Asia                    | Multiresistant                 | 136                    | Yes           | 19                         |
| 304-2        | 5                       | 5992527                       | 2021       | China       | Asia                    | Multiresistant                 | 167                    | Yes           | 43                         |
| BB1539       | 4                       | 5588409                       | 2014       | Venezuela   | South America           | Resistant                      | 176                    | Yes           | 29                         |
| BB1541       | 4                       | 5588326                       | 2014       | Venezuela   | South America           | Resistant                      | 176                    | Yes           | 29                         |
| BB1542       | 4                       | 5588444                       | 2014       | Venezuela   | South America           | Resistant                      | 176                    | Yes           | 29                         |
| CP-84        | 0                       | 5169325                       | 2021       | Colombia    | South America           | Susceptible                    | 155                    | Yes           | 61                         |
| CRhvKp1699   | 1                       | 5651801                       | 2004       | Taiwan      | Asia                    | Susceptible                    | 124                    | Yes           | 21                         |

|              |   |         |      |         |      |                |     |     |    |
|--------------|---|---------|------|---------|------|----------------|-----|-----|----|
| CRhvKp196    | 5 | 5887202 | 2009 | Taiwan  | Asia | Multiresistant | 175 | Yes | 20 |
| CRhvKp547    | 1 | 5466382 | 2020 | Taiwan  | Asia | Resistant      | 121 | Yes | 22 |
| CRhvKp710    | 4 | 5447195 | 2004 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 120 | Yes | 25 |
| IVRI_FBI_611 | 2 | 5243170 | 2019 | India   | Asia | Susceptible    | 119 | Yes | 27 |
| IVRI_FBI_615 | 0 | 5244211 | 2019 | India   | Asia | Susceptible    | 119 | Yes | 30 |
| IVRI_FBI_622 | 0 | 5560458 | 2019 | India   | Asia | Susceptible    | 132 | Yes | 30 |
| IVRI_FBI_623 | 0 | 5676313 | 2019 | India   | Asia | Susceptible    | 123 | Yes | 30 |
| KC187        | 7 | 5587569 | 2024 | China   | Asia | Multiresistant | 146 | Yes | 20 |
| Klebsiella   | 0 | 5696702 | 2023 | India   | Asia | Resistant      | 132 | Yes | 30 |
| KpA1806      | 2 | 5532872 | 2013 | China   | Asia | Multiresistant | 132 | Yes | 63 |
| KpA7002      | 0 | 5649094 | 2022 | Armenia | Asia | Multiresistant | 133 | Yes | 41 |
| Kpn-A45      | 0 | 5195495 | 2025 | China   | Asia | Resistant      | 120 | Yes | 14 |
| Kpn-A53      | 1 | 5682690 | 2024 | China   | Asia | Susceptible    | 124 | Yes | 28 |
| KpSJTU083    | 0 | 5207043 | 2021 | China   | Asia | Susceptible    | 119 | Yes | 30 |
| KpSJTU083C1  | 0 | 5291519 | 2021 | China   | Asia | Susceptible    | 127 | Yes | 30 |
| KpSJTU083C2  | 0 | 5290442 | 2021 | China   | Asia | Susceptible    | 127 | Yes | 30 |
| KpSJTU083C3  | 0 | 5291518 | 2021 | China   | Asia | Susceptible    | 127 | Yes | 30 |
| KpSJTU083C4  | 0 | 5291209 | 2021 | China   | Asia | Susceptible    | 127 | Yes | 30 |
| KPZM16       | 4 | 5433331 | 2021 | China   | Asia | Resistant      | 135 | Yes | 14 |
| KPZM6        | 1 | 5397156 | 2020 | China   | Asia | Susceptible    | 125 | Yes | 14 |
| L3           | 3 | 5798592 | 2022 | China   | Asia | Susceptible    | 122 | Yes | 32 |
| LAhvKp03     | 1 | 5591987 | 2017 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 125 | Yes | 22 |
| LAhvKp100    | 1 | 5695762 | 2017 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 123 | Yes | 14 |
| LAhvKp135    | 1 | 5669416 | 2017 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 128 | Yes | 22 |
| LAhvKp138    | 1 | 5636660 | 2007 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 127 | Yes | 22 |
| LAhvKp141    | 1 | 5547845 | 2017 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 123 | Yes | 22 |
| LAhvKp142    | 2 | 5753127 | 2007 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 126 | Yes | 15 |
| LAhvKp143    | 1 | 5543594 | 2007 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 125 | Yes | 32 |
| LAhvKp150    | 1 | 5670460 | 2017 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 125 | Yes | 21 |
| LAhvKp163    | 1 | 5636887 | 2017 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 125 | Yes | 22 |
| LAhvKp179    | 2 | 5700631 | 2017 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 125 | Yes | 21 |
| LAhvKp198    | 2 | 5728873 | 2007 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 125 | Yes | 8  |
| LAhvKp199    | 1 | 5812850 | 2007 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 125 | Yes | 13 |
| LAhvKp211    | 1 | 5666271 | 2007 | Taiwan  | Asia | Susceptible    | 126 | Yes | 22 |

|             |    |         |      |           |               |                      |     |     |    |
|-------------|----|---------|------|-----------|---------------|----------------------|-----|-----|----|
| LAhvKp218   | 1  | 5557348 | 2007 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 125 | Yes | 28 |
| LAhvKp228   | 1  | 5613214 | 2007 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 123 | Yes | 7  |
| LAhvKp23    | 1  | 5677222 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 126 | Yes | 21 |
| LAhvKp232   | 1  | 5832049 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 126 | Yes | 19 |
| LAhvKp233   | 2  | 5504540 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Resistant            | 124 | Yes | 0  |
| LAhvKp237   | 1  | 5690186 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 123 | Yes | 16 |
| LAhvKp238   | 2  | 5718204 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 125 | Yes | 8  |
| LAhvKp24    | 1  | 5722124 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 125 | Yes | 15 |
| LAhvKp241   | 1  | 5220167 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 123 | Yes | 13 |
| LAhvKp37    | 2  | 5639947 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 125 | Yes | 22 |
| LAhvKp41    | 1  | 5473728 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 126 | Yes | 32 |
| LAhvKp46    | 0  | 5205922 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 124 | Yes | 13 |
| LAhvKp53    | 1  | 5636127 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 125 | Yes | 21 |
| LAhvKp62    | 1  | 5637332 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 125 | Yes | 22 |
| LAhvKp90    | 2  | 5632902 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 125 | Yes | 16 |
| LAhvKp99    | 1  | 5216655 | 2017 | Taiwan    | Asia          | Susceptible          | 121 | Yes | 14 |
| P35         | 6  | 5676295 | 2015 | Brazil    | South America | Multiresistant (XDR) | 226 | Yes | 20 |
| RKI 380DKa  | 0  | 6273634 | 2022 | Indonesia | Asia          | Multiresistant       | 213 | Yes | 53 |
| VA585-22    | 2  | 5615879 | 2022 | Chile     | South America | Multiresistant       | 189 | Yes | 51 |
| VA591       | 4  | 5653497 | 2019 | Chile     | South America | Multiresistant       | 194 | Yes | 63 |
| VA684       | 6  | 5775575 | 2019 | Chile     | South America | Multiresistant       | 171 | Yes | 30 |
| VRI_FBI_612 | 0  | 5322401 | 2019 | India     | Asia          | Susceptible          | 127 | Yes | 30 |
| VRI_FBI_613 | 0  | 5582130 | 2019 | India     | Asia          | Susceptible          | 132 | Yes | 30 |
| Zagreb001   | 10 | 6173749 | 2021 | Croatia   | Europe        | Multiresistant       | 189 | Yes | 55 |
| Zagreb002   | 6  | 5929528 | 2021 | Croatia   | Europe        | Multiresistant       | 183 | Yes | 55 |
| Zagreb003   | 7  | 6183206 | 2021 | Croatia   | Europe        | Multiresistant       | 194 | Yes | 55 |
| Zagreb004   | 9  | 6113624 | 2021 | Croatia   | Europe        | Multiresistant       | 189 | Yes | 39 |
| Zagreb005   | 10 | 6145937 | 2021 | Croatia   | Europe        | Multiresistant       | 188 | Yes | 55 |
| Zagreb006   | 4  | 5763611 | 2022 | Croatia   | Europe        | Multiresistant (XDR) | 187 | Yes | 21 |

|           |   |         |      |         |        |                      |     |     |    |
|-----------|---|---------|------|---------|--------|----------------------|-----|-----|----|
| Zagreb007 | 4 | 5763585 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb008 | 4 | 5539867 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant       | 154 | Yes | 21 |
| Zagreb009 | 6 | 5929528 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant       | 183 | Yes | 55 |
| Zagreb010 | 3 | 5671107 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant       | 155 | Yes | 21 |
| Zagreb012 | 5 | 6009914 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 199 | Yes | 37 |
| Zagreb013 | 6 | 5940632 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 182 | Yes | 55 |
| Zagreb014 | 4 | 5763610 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb015 | 4 | 5763702 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 186 | Yes | 21 |
| Zagreb016 | 3 | 5669925 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant       | 155 | Yes | 21 |
| Zagreb017 | 6 | 5627407 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant       | 153 | Yes | 43 |
| Zagreb018 | 4 | 5763586 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb019 | 4 | 5749165 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 176 | Yes | 21 |
| Zagreb020 | 4 | 5728200 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb022 | 3 | 5679255 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 163 | Yes | 21 |
| Zagreb023 | 4 | 5763611 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb024 | 4 | 5763612 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb025 | 7 | 5774191 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 204 | Yes | 21 |
| Zagreb026 | 4 | 5763096 | NN   | NN      | NN     | Multiresistant (XDR) | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb027 | 5 | 5818769 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant (XDR) | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb028 | 4 | 5764363 | 2022 | Croatia | Europe | Multiresistant       | 187 | Yes | 21 |

|           |    |         |      |         |        |                         |     |     |    |
|-----------|----|---------|------|---------|--------|-------------------------|-----|-----|----|
| Zagreb029 | 4  | 5740877 | 2022 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 167 | Yes | 21 |
| Zagreb030 | 6  | 5763850 | 2022 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb031 | 4  | 5763703 | 2022 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb032 | 4  | 5763585 | 2022 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb033 | 4  | 5746675 | 2022 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 169 | Yes | 21 |
| Zagreb034 | 4  | 5765738 | 2022 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb037 | 10 | 6183799 | 2021 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 189 | Yes | 55 |
| Zagreb042 | 4  | 5767010 | 2022 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb043 | 4  | 5764793 | 2022 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb044 | 4  | 5764481 | 2022 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 187 | Yes | 21 |
| Zagreb045 | 7  | 5885752 | 2022 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 188 | Yes | 54 |
| Zagreb046 | 9  | 5721287 | 2022 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 186 | Yes | 21 |
| Zagreb047 | 6  | 5940586 | 2022 | Croatia | Europe | (XDR)<br>Multiresistant | 182 | Yes | 55 |

*Nota:* Las columnas de año, país y grupo geográfico corresponden a la fecha y lugar en que fue aislada la cepa. XDR: Extreme drugo Resistant.

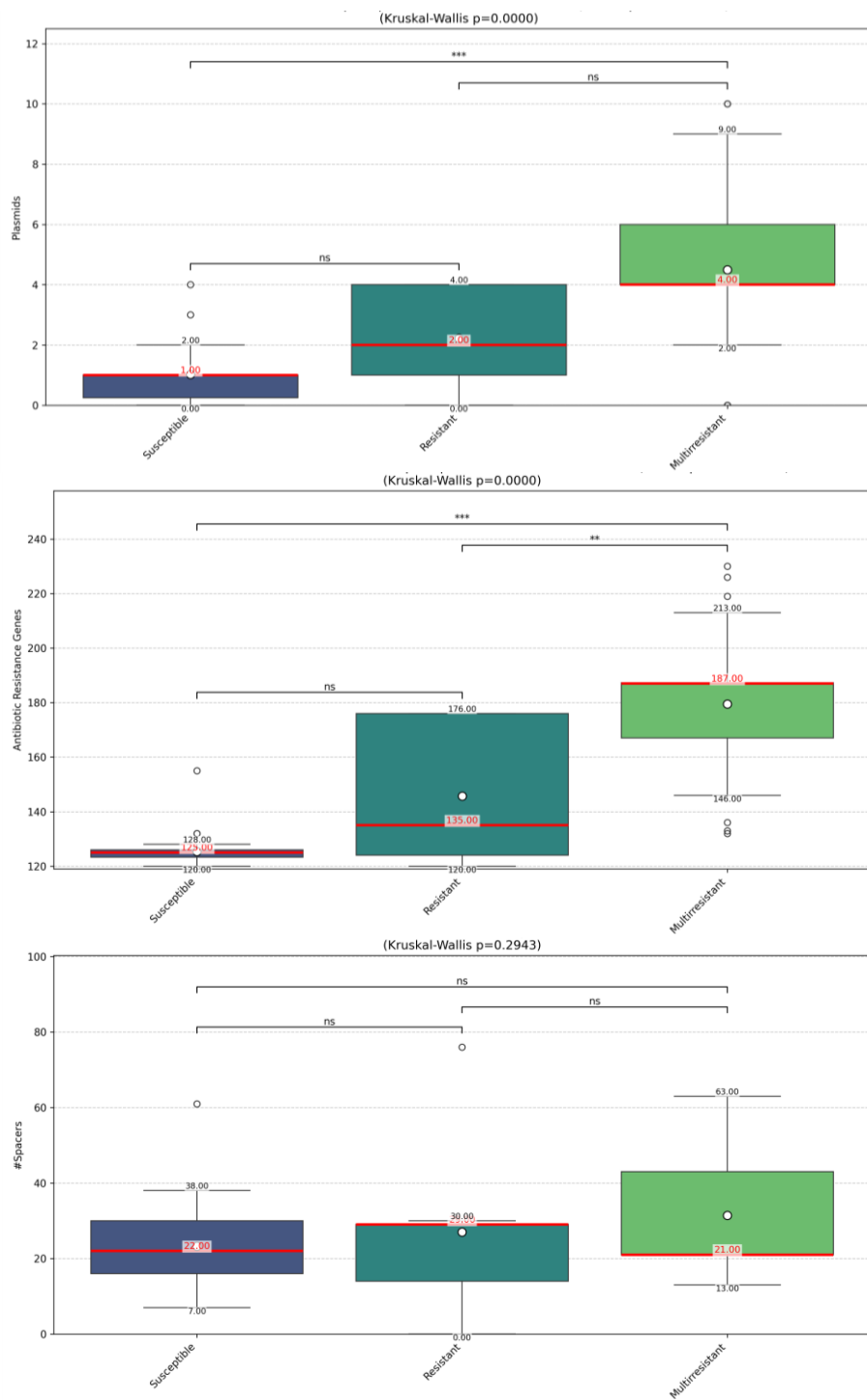
Entre las cepas con sistema CRISPR, el 59,1% presentó algún tipo de resistencia a antibióticos. Aunque podría esperarse que estas cepas exhibieran una mayor cantidad de plásmidos y determinantes genéticos de resistencia, la figura 4 muestra que no existen diferencias significativas entre cepas resistentes y susceptibles para ninguna de estas variables ( $p > 0,05$ ). En contraste, las cepas multirresistentes presentaron cantidades significativamente mayores de plásmidos y determinantes de resistencia en comparación con las susceptibles ( $p < 0,001$ ). Al comparar las cepas resistentes con las multirresistentes, no se observaron diferencias significativas en el número de plásmidos ( $p > 0,05$ ), aunque sí en la cantidad de determinantes genéticos de resistencia ( $p < 0,01$ ). Por otra parte, el número de espaciadores CRISPR no mostró diferencias significativas entre los distintos grupos analizados ( $p > 0,05$ ).

Se halló un total de 664 espaciadores únicos para las 115 cepas con sistema CRISPR, de los cuales 450 están presentes en cepas resistentes o multirresistentes y 23 de ellos están presentes en los tres fenotipos de resistencia evaluados, como se presenta en la figura 5. Asimismo, de estos espaciadores únicos se definieron 157 patrones de los cuales el 50.9% estaban conformados por espaciadores individuales y el 49.1% de entre 2 y 34 espaciadores.

En la figura 6 se muestra la organización de los patrones de espaciadores CRISPR dentro de los arreglos analizados. Las cepas fueron seleccionadas y agrupadas con el propósito de facilitar la visualización de similitudes entre los diferentes arreglos CRISPR. Destaca el caso de las cepas KpA1806, VA591 y 2024CK-00187\_Chromosome, aisladas en China en 2013, Chile en 2017 y Estados Unidos en 2023, respectivamente. A pesar de sus diferencias temporales y geográficas, estas cepas comparten la totalidad de los espaciadores presentes en el arreglo. La única variación corresponde a la cepa 2024CK-00187\_Chromosome, la cual presenta dos espaciadores duplicados, representados en la gráfica como espacios vacíos dentro del arreglo.

**Figura 4**

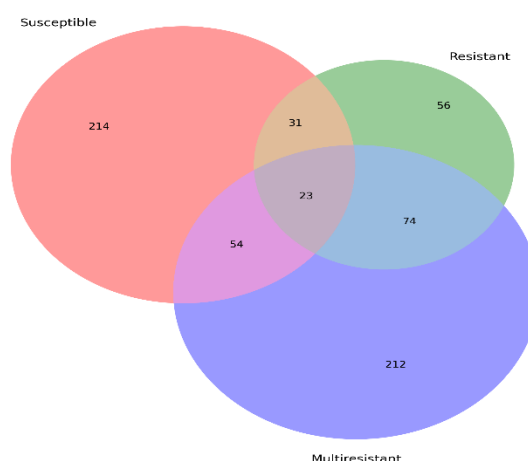
*Distribución de número de plásmidos, genes de resistencia antimicrobiana y espaciadores según el tipo de resistencia a antibióticos.*



*Nota:* Los puntos blancos dentro de las cajas corresponden a la media y la línea roja horizontal, con su respectivo valor numérico, indica la mediana. Los puntos blancos fuera de los rangos son Outliers. Se calculó el valor P a través del análisis Kruskal-Wallis y Test Post-Hoc de Dunn con corrección de Bonferroni ( $P < 0.05$ ). ns (no significativo,  $p > 0.05$ ), \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ ).

### Figura 5

*Frecuencia de espaciadores según la resistencia a antibióticos.*



*Nota:* El diagrama de Venn muestra la cantidad de espaciadores en relación al tipo de resistencia a antibióticos. Cada intersección representa el número de espaciadores compartidos entre los grupos.

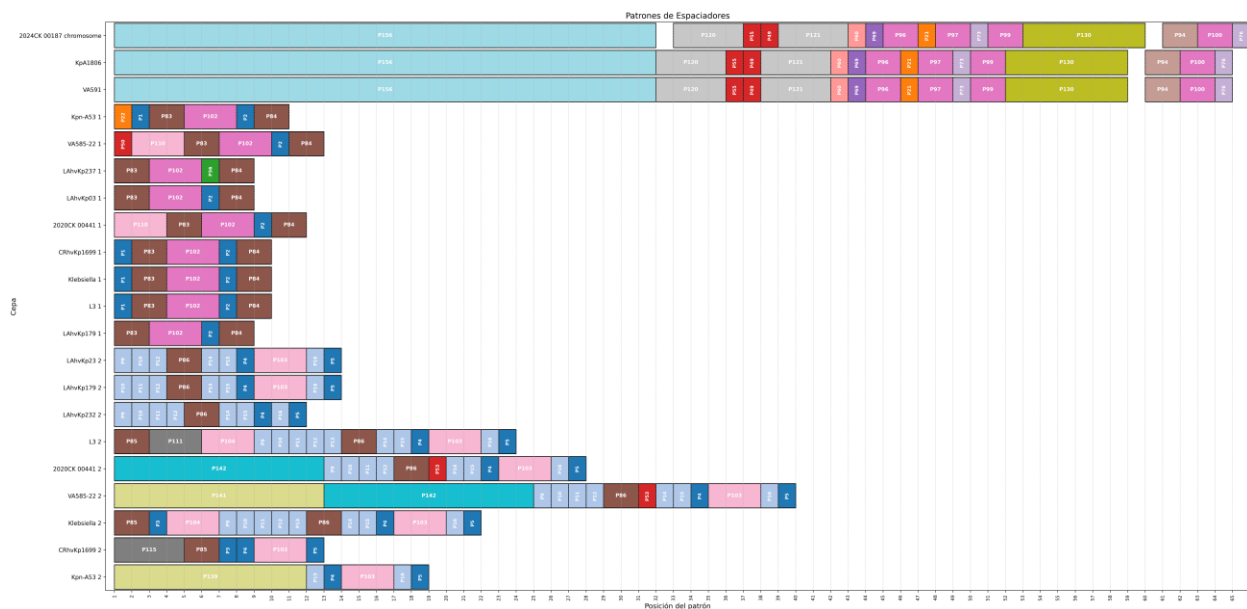
En los grupos conformados por las cepas Kpn-A53, VA585-22, LAhvKp237, LAhvKp03, 2020CK-00441, CRhvKp1699, Klebsiella, L3, LAhvKp179 y LAhvKp232, aisladas en China (2024), Chile (2022), Taiwán (2017), Taiwán (2017), Estados Unidos (2020), Taiwán (2004), India (2023), China (2022), Taiwán (2017) y Taiwán (2017), respectivamente, presentan una alta similitud en dos arreglos CRISPR por cepa, compartiendo múltiples patrones de espaciadores entre sí. Sin embargo, debido a la menor longitud de estos arreglos, no es posible

establecer con claridad si dicha similitud corresponde a la transmisión completa de los arreglos CRISPR o si se relaciona con exposiciones a periodos de infección y presión selectiva similares.

Para otras cepas se encontraron arreglos únicos para dichas cepas, o compartidos únicamente entre cepas del mismo país, y presumiblemente el mismo laboratorio, debido al nombre de las cepas. Estas últimas, así como las gráficas de la organización de los demás patrones se pueden ver en el apéndice I.

## Figura 6

*Organización de patrones de espaciadores dentro de los arreglos CRISPR.*



*Nota:* La gráfica muestra tres grupos principales de patrones de espaciadores CRISPR, representados por los colores naranja, rosa y morado. Las cepas se organizaron de forma que estuvieran contiguas a cepas que comparten patrones similares.

Vale la pena mencionar dos cepas: La primera, a pesar de contar únicamente con la proteína Cas3, presentaba un arreglo CRISPR íntegro con 48 espaciadores. Mientras que otra cepa, pese a contar con un número apreciable de proteínas Cas, este no contaba con arreglo CRISPR. Esto probablemente implica que estos arreglos están en proceso de ser eliminados, o

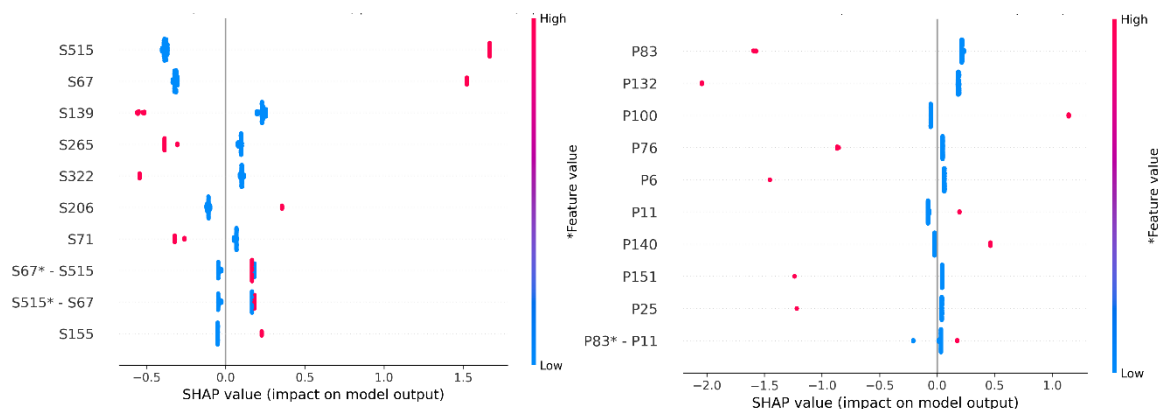
que las proteínas fueron reclutadas para un proceso diferente al que originalmente fue descrito para CRISPR.

Las métricas de desempeño de los modelos XGBoost fueron las siguientes: El modelo tomando los espaciadores como predictores tuvo una exactitud (accuracy) de 0.8571. En el promedio macro tuvo una precisión de 0.85, sensibilidad (recall) de 0.86, y un F-1-Score de 0.85. El modelo tomando los patrones como predictores tuvo una exactitud de 0.8500. En el promedio macro tuvo una precisión de 0.84, sensibilidad (recall) de 0.85 y un F-1-Score de 0.83.

Los análisis SHAP, representados en la figura 4, por un lado, mostraron que espaciadores como S515 y S67 individualmente contribuyen en gran medida a la predicción de cepas resistentes. Cuando ambos espaciadores están presentes tienen una interacción negativa que produce una disminución en el potencial de predicción. Otros espaciadores, como S139, S322, S265 y S71 contribuyen con mayor frecuencia a la predicción de cepas susceptibles. Por otro lado, solo los patrones de espaciadores CRISPR P100, P140 y P11 están asociados positivamente en la predicción de resistencia a antibióticos. Los demás patrones tienden a contribuir con mayor peso en la predicción de cepas susceptibles. Cabe resaltar que estas asociaciones entre espaciadores y fenotipo de resistencia a antibióticos solo es aplicable en cepas con sistema CRISPR/Cas, por lo tanto, puede haber múltiples correlatos genéticos que contribuyan en el fenotipo de resistencia.

**Figura 7**

*Capacidad de predicción de resistencia a antibióticos de espaciadores y patrones CRISPR.*



*Nota:* La gráfica muestra el impacto y la direccionalidad de los espaciadores (izquierda) y patrones (derecha) que más contribuyen en la predicción de resistencia a antibióticos en cepas con sistema CRISPR. Valores SHAP positivos indican una mayor influencia para la predicción de cepas resistentes, en cambio, valores negativos indican una mayor asociación con cepas susceptibles. Los puntos de color rojo hacen referencia a un valor alto para esa característica, mientras que los puntos de color azul indican un valor bajo para esa característica.

## 2.4. Discusión.

En el presente estudio, menos de la mitad de las cepas de *K. pneumoniae* presentaron sistema CRISPR/Cas. Dentro de este grupo se observaron cepas susceptibles, resistentes y multirresistentes, indicando que la presencia de CRISPR/Cas no excluye la coexistencia con perfiles de resistencia antibiótica. A pesar de que las cepas resistentes fueron más frecuentes que las cepas susceptibles entre las CRISPR-positivas, las comparaciones estadísticas mostraron que no hubo diferencias significativas en cantidad de plásmidos y determinantes genéticos de resistencia o espaciadores. En contraste, las cepas multirresistentes mostraron una mayor carga de plásmidos y genes de resistencia frente a las susceptibles, pero el número de espaciadores no difirió entre las categorías analizadas. Los resultados sugieren que la asociación entre

CRISPR/Cas y la resistencia antibiótica es compleja y no puede interpretarse de forma binaria, es decir, que la presencia de CRISPR equivalga a menor resistencia.

Se identificaron 664 espaciadores y 157 patrones de espaciadores, lo que evidencia una alta variabilidad en la composición de los arreglos CRISPR. Una proporción importante de estos espaciadores fue encontrada en cepas resistentes y multirresistentes, pero esta observación puede deberse a la composición de la muestra, la sobrerrepresentación de ciertos grupos geográficos o clonales y/o una mayor frecuencia de cepas resistentes dentro del conjunto de datos. A pesar de esto, los datos apoyan el valor de los arreglos CRISPR como marcadores de variabilidad entre cepas.

La elevada similitud en los arreglos CRISPR de las cepas KpA1806, VA591 y 2024CK 00187\_Chromosome resulta relevante ya que la presencia de arreglos largos con la misma composición y organización de espaciadores difícilmente se explicaría por eventos independientes de adquisición siguiendo el mismo orden. Con los datos disponibles no es posible establecer si esta similitud se debe a la conservación vertical dentro de un linaje relacionado, ancestría común, recombinación o transferencia del locus. Por lo tanto, la explicación más prudente es que la conservación completa del arreglo CRISPR entre cepas aisladas en distintos países y años sugiere una historia evolutiva común. De manera similar, el segundo grupo de cepas mencionado en la sección de resultados compartió varios patrones de espaciadores pertenecientes a dos arreglos CRISPR, pero la menor longitud de estos arreglos limita el alcance de las inferencias comparado con el primer caso descrito. Sin embargo, con los datos actuales no es posible inferir rutas de transmisión, dirección de circulación geográfica ni eventos de dispersión internacional. Para evaluar esta posibilidad sería necesario complementar el análisis

con MLST, cgMLST o filogenia de genoma completo, junto con metadatos epidemiológicos confiables

En cuanto a la hipótesis de que los sistemas CRISPR/Cas pueden limitar la transferencia horizontal de genes, y, en consecuencia, se asocian con menor resistencia antimicrobiana, los resultados obtenidos evidencian un comportamiento más complejo. Si bien los modelos predictivos mostraron que algunos espaciadores y patrones CRISPR contribuyen negativamente a la clasificación de cepas resistentes, mientras que otros contribuyeron positivamente, estos valores no deben tomarse como evidencia de que dichos espaciadores participen funcionalmente en la resistencia antimicrobiana. Es importante resaltar que los valores SHAP indican la contribución de cada variable a la clasificación realizada por el modelo, pero no establecen causalidad biológica. Por lo tanto, los espaciadores o patrones identificados pueden interpretarse mejor como marcadores indirectos de linajes bacterianos, procedencia geográfica, historia evolutiva compartida o exposición previa a elementos genéticos móviles.

La coexistencia del CRISPR/Cas con plásmidos y determinantes de resistencia sugiere que algunos sistemas no son funcionales o presentan una actividad limitada ante los elementos móviles presentes en cada cepa. La funcionalidad de CRISPR/Cas depende de la integridad del locus, la presencia de genes Cas esenciales, la complementariedad entre los espaciadores y las secuencias blanco y la expresión del sistema (Shabbir et al., 2016; Cheng et al., 2024). Por esta razón, la sola detección de los arreglos CRISPR o de sus genes Cas no permiten inferir que existe una inmunidad activa. Esta consideración es especialmente importante entre cepas que presentan genes Cas sin arreglo CRISPR y viceversa.

Una limitación del trabajo fue la carencia de variables de parentesco genómico entre cepas para reducir controlar la estructura clonal típica de *K. pneumoniae*. Además, no se analizó

en detalle el origen probable de los espaciadores, es decir origen viral o plasmídico, lo que limita la interpretación ecológica y funcional de los arreglos.

En conjunto, los resultados apoyan el uso de los arreglos CRISPR/Cas como marcadores descriptivos complementarios de la variabilidad intraespecífica y posible relación entre cepas de *K. pneumoniae*. Análisis futuros incluirán la filogenia del genoma completo, análisis de la identidad de los espaciadores y la funcionalidad de los sistemas CRISPR/Cas en las cepas con el fin de obtener mayor precisión entre la relación de este sistema con otros que portan las bacterias y el fenotipo resistente.

### 3. Conclusiones

En las cepas analizadas de *Klebsiella pneumoniae*, el sistema CRISPR/Cas estuvo presente en menos de la mitad de los genomas evaluados y correspondió exclusivamente al subtipo I-E, con una baja proporción localizada en plásmidos. Dentro de las cepas con sistema CRISPR predominó el fenotipo resistente o multirresistente, lo que indica que la presencia de este sistema no se asocia necesariamente con una menor resistencia a antibióticos.

Se identificó una alta variabilidad en los arreglos CRISPR, expresada en 664 espaciadores únicos y 157 patrones de espaciadores, con una mayor proporción en cepas resistentes y multirresistentes, lo que respalda el carácter dinámico de este sistema y su potencial utilidad para explorar relaciones entre cepas y procesos de adaptación bacteriana.

Los resultados obtenidos sugieren una relación compleja entre el sistema CRISPR/Cas y la resistencia antimicrobiana. Aunque algunos espaciadores y patrones CRISPR se asociaron con la predicción de cepas susceptibles, otros contribuyeron positivamente a la predicción de resistencia. Sin embargo, serían necesarios análisis funcionales adicionales para evaluar con mayor precisión el grado de interferencia del sistema sobre la transferencia horizontal de genes.

La elevada similitud observada entre los arreglos CRISPR de algunas cepas aisladas en distintos países y años sugiere la posible conservación o transmisión de arreglos CRISPR entre linajes bacterianos relacionados lo que respalda el potencial del sistema CRISPR/Cas como marcador poblacional y epidemiológico en *K. pneumoniae*. La organización y similitud de los arreglos podrían aportar información útil para estudiar relaciones evolutivas, dispersión geográfica y circulación de cepas bacterianas. Sin embargo, aunque los datos podrían sugerir posibles rutas de circulación geográfica de cepas a partir de los metadatos, estas interpretaciones

requieren evidencia complementaria, como análisis con MLST, cgMLST, filogenómicos o epidemiológicos, antes de establecer patrones de transmisión internacional.

#### **4. Recomendaciones**

Ampliar la representatividad de las muestras analizadas, procurando reducir posibles sesgos derivados de la sobrerrepresentación de determinados grupos geográficos, linajes o fenotipos de resistencia.

Incorporar metodologías como MLST, cgMLST o filogenómica de genoma completo, con el fin de identificar la estructura clonal de las cepas y diferenciar con mayor precisión los efectos del linaje de aquellos asociados al sistema CRISPR/Cas.

Investigar el origen de los espaciadores CRISPR, para determinar si los espaciadores identificados están asociados principalmente con secuencias virales o plasmídicas y mejorar la interpretación ecológica y evolutiva de los arreglos.

### Referencias Bibliográficas

- Armstrong, G. L. (1999). Trends in Infectious Disease Mortality in the United States During the 20th Century. *JAMA*, 281(1), 61.
- Barber, M., & Rozwadowska-Dowzenko, M. (1948). Infection by penicillin-resistant Staphylococci. *The Lancet*, 252(6530), 641-644.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712.
- Bondi Jr, A., & Dietz, C. C. (1945). Penicillin resistant Staphylococci. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 60(1), 55-58.
- Chen, Q., Wang, M., Han, M., Xu, L., & Zhang, H. (2023). Molecular basis of Klebsiella pneumoniae colonization in host. *Microbial pathogenesis*, 177, 106026.
- Cheng, H., Deng, H., Ma, D., Gao, M., Zhou, Z., Li, H., Liu, S. & Teng, T. (2024). Insight into the natural regulatory mechanisms and clinical applications of the CRISPR-Cas system. *Heliyon*, 10(20).
- Cohen, M. L. (1992). Epidemiology of drug resistance: implications for a post—antimicrobial era. *Science*, 257(5073), 1050-1055.
- Col, N. F., & O'Connor, R. W. (1987). Estimating worldwide current antibiotic usage: report of Task Force 1. *Reviews of infectious diseases*, 9(Supplement\_3), S232-S243.
- Compton A. (1942). Bacteriophage Treatment of Bacillary Dysentery. *British medical journal*, 1(4249), 719–720.
- Couvin, D., Bernheim, A., Toffano-Nioche, C., Touchon, M., Michalik, J., Néron, B., Rocha, E. P. C., Vergnaud, G., Gautheret, D. & Pourcel, C. (2018). CRISPRCasFinder, an update of

- CRISRFinder, includes a portable version, enhanced performance and integrates search for Cas proteins. *Nucleic acids research*, 46(W1), W246-W251.
- De Oliveira, D. M., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L. & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical microbiology reviews*, 33(3), 10-1128.
- Díez-Villaseñor, C., Almendros, C., García-Martínez, J., & Mojica, F. J. (2010). Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 156(5), 1351-1361.
- DuPont, H. L., & Steele, J. H. (1987). Use of antimicrobial agents in animal feeds: implications for human health. *Reviews of infectious diseases*, 9(3), 447-460.
- Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. & Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320), 67-71.
- Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T. R., Hsu, L. Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M. B., Edwards, D. J., Nguyen, K. V., Nguyen, T. V., Dao, T. T., ... & Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27), E3574-E3581.
- Instituto Nacional de Salud. (2019). Informe de resultados de la vigilancia por laboratorio de resistencia antimicrobiana en infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) A 2018. Ministerio de Salud. <https://www.ins.gov.co/BibliotecaDigital/informe-vigilancia-por-laboratorio-resistencia-antimicrobiana-y-whonet-iaas-2018.pdf>

- Instituto Nacional de Salud. (2022). Protocolo de Vigilancia de Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en el ámbito hospitalario. Ministerio de salud. [https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/Lineamientos/Pro\\_Resistencia%20bacteriana%202022.pdf](https://www.ins.gov.co/buscadoreventos/Lineamientos/Pro_Resistencia%20bacteriana%202022.pdf)
- Jiang, W., Maniv, I., Arain, F., Wang, Y., Levin, B. R., & Marraffini, L. A. (2013). Dealing with the evolutionary downside of CRISPR immunity: bacteria and beneficial plasmids. *PLoS genetics*, 9(9), e1003844.
- Kadkhoda, H., Gholizadeh, P., Ghotaslou, R., Pirzadeh, T., Ahangarzadeh Rezaee, M., Nabizadeh, E., ... & Aghazadeh, M. (2024). Prevalence of the CRISPR-cas system and its association with antibiotic resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *BMC Infectious Diseases*, 24(1), 554.
- Kamruzzaman, M., & Iredell, J. R. (2020). CRISPR-Cas system in antibiotic resistance plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*, 10, 2934.
- Kim, D. W., & Cha, C. J. (2021). Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Experimental & molecular medicine*, 53(3), 301-309.
- Leitner, L., Sybesma, W., Chanishvili, N., Goderdzishvili, M., Chkhotua, A., Ujmajuridze, A., Schneider M., Sartori, A., Mehnert, U., Bachmann, L. & Kessler, T. M. (2017). Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *BMC urology*, 17, 1-6.
- Li, H. Y., Kao, C. Y., Lin, W. H., Zheng, P. X., Yan, J. J., Wang, M. C., Teng, C. H., Tseng, C. C. & Wu, J. J. (2018). Characterization of CRISPR-Cas systems in clinical *Klebsiella*

- pneumoniae isolates uncovers its potential association with antibiotic susceptibility. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1595.
- Long, J., Zhang, J., Xi, Y., Zhao, J., Jin, Y., Yang, H., Chen, S. & Duan, G. (2023). Genomic insights into CRISPR-harboring plasmids in the *Klebsiella* genus: distribution, backbone structures, antibiotic resistance, and virulence determinant profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(3), e01189-22.
- Marraffini, L. A., & Sontheimer, E. J. (2008). CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science*, 322(5909), 1843-1845.
- McKee, C. M., & Houck, C. L. (1943). Induced resistance to penicillin of cultures of staphylococci, pneumococci and streptococci. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 53(1), 33-34.
- Miller, W. R., & Arias, C. A. (2024). ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nature Reviews Microbiology*, 22(10), 598-616.
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. H., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Hamadani, B. H. K., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., Achalapong, S., ... & Tasak, N. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The lancet*, 399(10325), 629-655.
- Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., Dempsey, D. M., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Kenyon, R. W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G. J., ... Stevens, R. L. (2023). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource

- Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic acids research*, 51(D1), D678–D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/8558ccb1-e680-4c91-9dcf-a74f162ea031/content>
- Organización Mundial de la Salud. (2024). WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/1a41ef7e-dd24-4ce6-a9a6-1573562e7f37/content>
- Organización Mundial de la Salud. (2025). Global antibiotic resistance surveillance report 2025. <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/8831cd08-44cc-4741-9e30-5b1293150bda/content>
- Plough, H. H. (1945). Penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and its clinical implications. *American journal of clinical pathology*, 15(10), 446-451.
- Rammelkamp, C. H., & Maxon, T. (1942). Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 51(3), 386-389.
- Schooley, R. T., Biswas, B., Gill, J. J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., Barr, J., Reed, S., Rohwer, F., Benler, S., Segall, A., Taplitz, R., Smith, D., Kerr, K., Kumaraswamy, M., Nizet, V., Lin, L., McCauley, M., Strathdee, S., Benson, C., Pope, R., Leroux, B., Picel, A., Mateczun, A., Cilwa, K., Regeimbal, J., Estrella, L., Wolfe, D., Henry, M., Quinones, J., Salka, S., Bishop-Lilly, K., Young, R. & Hamilton, T. (2017).

- Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(10), 10-1128.
- Shabbir, M. A. B., Hao, H., Shabbir, M. Z., Hussain, H. I., Iqbal, Z., Ahmed, S., Sattar, A., Iqbal, M., Li, J. & Yuan, Z. (2016). Survival and evolution of CRiSPR–Cas system in prokaryotes and its applications. *Frontiers in immunology*, 7, 375.
- Shen, J., Lv, L., Wang, X., Xiu, Z., & Chen, G. (2017). Comparative analysis of CRISPR-Cas systems in *Klebsiella* genomes. *Journal of basic microbiology*, 57(4), 325-336.
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Frontiers in microbiology*, 9, 2066.
- Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., & Osek, J. (2022). Antibiotic resistance in bacteria—A review. *Antibiotics*, 11(8), 1079.
- Wiedenheft, B., & Bondy-Denomy, J. (2017). CRISPR control of virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Research*, 27(2), 163-164.
- Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2018). *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current opinion in microbiology*, 45, 131-139.
- Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 344–359.  
<https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>