

Estudio de la diversidad genética de los sistemas CRISPR/Cas como herramienta de tipificación en aislados de *Klebsiella pneumoniae* resistente a antibióticos.

Laura Vargas Rodríguez

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magister en Microbiología

Directora

Mayra Alejandra Machuca Pérez

PhD en Microbiología

Codirector

José Arturo Gutiérrez Triana

PhD en Ciencias Naturales

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2025

"So never mind the darkness, we still can find a way."

Guns N' Roses

Dedicatoria

A todos los que me han acompañado en esta travesía, recordándome que la vida es un constante acto de superación. Dedico este trabajo a la fuerza inquebrantable del corazón humano, capaz de transformar las adversidades en aprendizajes y los desafíos en caminos. A las redes de apoyo que nos sostienen en los momentos más inciertos, y al amor de mis seres queridos, cuya luz ha sido mi guía constante. Este logro es también suyo, porque nunca he caminado sola.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas y entidades que hicieron posible la realización de este trabajo, cada una de ellas desempeñó un papel crucial en este camino.

A mis seres queridos, mi familia y mis amigos, quienes con su amor y apoyo incondicional me acompañaron en cada paso de este proceso. Su fe en mí y su inspiración constante fueron la luz que me guio en los momentos más desafiantes. Este logro también les pertenece.

A mis directores, la Dra. Mayra Machuca y el Dr. Arturo Gutiérrez, por ser los faros que iluminaron este camino. Su guía, paciencia y compromiso me motivaron a dar siempre lo mejor de mí.

A mis compañeros de maestría, quienes más que nadie entendieron los retos de este proceso. Gracias por su apoyo constante, por compartir sus conocimientos y por hacer de este trayecto algo más llevadero con su amistad.

A la Universidad Industrial de Santander, mi alma mater, por ser el pilar de mi formación profesional y la institución que me permitió forjar este sueño. A la Dirección de Posgrados, mi más profundo agradecimiento por el apoyo económico que me permitió avanzar y concluir esta meta.

Finalmente, al Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM), gracias por acogerme como un miembro más, por brindarme las herramientas necesarias y por crear un entorno de aprendizaje que me permitió culminar con éxito este proyecto.

A todos ustedes, gracias por ser parte de este viaje.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción.....	12
1. Objetivos	15
1.1. Objetivo General.....	15
1.2. Objetivos Específicos.....	15
2. Marco conceptual.....	16
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
2.1.1. Resistencia a los antibióticos en <i>K. pneumoniae</i>	17
2.1.2. Caracterización molecular de <i>K. pneumoniae</i>	18
2.2. Sistemas CRISPR/Cas.....	20
2.3. Sistemas CRISPR/Cas en <i>K. pneumoniae</i>	26
3. Metodología.....	28
3.1. Aislamientos clínicos y cepas de referencia.....	28
3.2. Extracción de ADN.....	29
3.3. Detección molecular del locus CRISPR	30
3.4. Diseño de iniciadores para la amplificación y secuenciación de los arreglos CRISPR	31
3.5. Detección molecular de <i>bla_{SHV}</i> y <i>bla_{KPC}</i> y <i>fimH_1</i>	32
3.6. Determinación del perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos	33
3.7. Análisis estadístico	33
3.8. Aspectos éticos	33
4. Resultados	36

4.1.	Recolección de aislamientos clínicos.....	36
4.2.	Prevalencia de los sistemas CRISPR en los aislamientos clínicos	36
4.3.	Distribución de genes de resistencia y virulencia.....	37
4.4.	Perfiles de susceptibilidad/resistencia a los antibióticos en los aislamientos clínicos 40	
4.5.	Asociación entre la resistencia a antibióticos y los sistemas CRISPR	42
4.6.	Caracterización de los arreglos CRISPR1 y CRISPR2 en los aislamientos clínicos que presentan el sistema CRISPR	44
5.	Discusión.....	50
6.	Conclusiones.....	57
7.	Recomendaciones	59
	Referencias Bibliográficas.....	60
	Apéndices	68

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1 <i>Características genotípicas y fenotípicas de las cepas de referencias utilizadas en el estudio</i>	29
Tabla 2 <i>Iniciadores y condiciones de amplificación para la detección de los genes de interés para el estudio</i>	34
Tabla 3 <i>Detección de los genes de resistencia y virulencia en los aislamientos clínicos</i>	39
Tabla 4 <i>Distribución de genes entre CRISPR/Cas+ y CRISPR/Cas- con valores p</i>	39
Tabla 5 <i>Perfil de resistencia de los aislamientos clínicos clasificados como MDR</i>	41
Tabla 6 <i>Tasas de resistencia a antibióticos entre aislamientos CRISPR/Cas positivos y negativos de K. pneumoniae</i>	43
Tabla 7 <i>Perfiles MDR entre los aislamientos CRISPR/Cas positivos y negativos de K. pneumoniae</i>	44
Tabla 8 <i>Composición de los arreglos CRISPR1 y CRISPR2 en los seis (6) aislamientos secuenciados</i>	46
Tabla 9 <i>Espaciadores encontrados en los arreglos CRISPR que coinciden con genomas, plásmidos o fagos</i>	47

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. <i>Arquitectura genómica del locus CRISPR en procariotas</i>	21
Figura 2 <i>Arquitectura del módulo efector de los sistemas CRISPR</i>	24
Figura 3 <i>Etapas del proceso de inmunidad mediada por CRISPR en procariotas</i>	25
Figura 4 <i>Arquitectura del locus CRISPR según el tipo de sistema identificado</i>	30
Figura 5 <i>Amplificación del ITS 16S-23S rDNA específico para K. pneumoniae.</i>	36
Figura 6 <i>Amplificación de los genes cas1 y cas 3 para la detección del sistema CRISPR</i>	37
Figura 7 <i>Amplificación de los genes bla_{SHV}, bla_{KPC} y fimH1 en los aislamientos clínicos</i>	38
Figura 8 <i>Distribución de los perfiles de susceptibilidad/resistencia en los aislamientos clínicos</i>	40
Figura 9 <i>Tasas de resistencia a antibióticos entre aislamientos CRISPR/Cas positivos y negativos de K. pneumoniae</i>	42
Figura 10 <i>Amplificación de los arreglos CRISPR1 y CRISPR2 de los aislamientos con CRISPR</i>	44

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A. Caracterización fenotípica y molecular de los aislamientos clínicos de <i>K. pneumoniae</i>	68
Apéndice B. Alineamiento de secuencia del arreglo CRISPR de un aislamiento de <i>K. pneumoniae</i> de Colombia con un aislamiento de Taiwán.....	70

Resumen

Título: Estudio de la diversidad genética de los sistemas CRISPR/Cas como herramienta de tipificación en aislados de *Klebsiella pneumoniae* resistente a antibióticos*

Autor: Laura Vargas Rodríguez**

Palabras Clave: *Klebsiella pneumoniae*, Sistemas CRISPR-Cas, Farmacorresistencia Bacteriana, Tipificación Molecular.

Descripción:

Klebsiella pneumoniae se caracteriza por presentar diversos mecanismos de resistencia a antimicrobianos, limitando las opciones terapéuticas. Los sistemas CRISPR-Cas proporcionan una defensa inmunitaria adaptativa en procariontes contra elementos genéticos móviles. En los últimos años, este sistema ha revelado un papel en la resistencia antibiótica y la dinámica de plásmidos en *K. pneumoniae*. Este estudio quiso determinar la variabilidad genética de los arreglos CRISPR y su utilidad en la tipificación de aislados de *K. pneumoniae* resistentes a antibióticos de Bucaramanga, Colombia.

Se llevó a cabo la detección, clasificación y secuenciación del locus CRISPR mediante PCR convencional y secuenciación de Sanger, para relacionar su presencia con los perfiles fenotípicos de susceptibilidad antibiótica, y la prevalencia de genes de resistencia y factores de virulencia en 34 aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*.

La prevalencia del sistema CRISPR en los aislamientos fue del 24%, los cuales se clasificaron en tipo I-E (9%) y subtipo I-E* (15%). Se detectó *bla_{SHV}*, *bla_{KPC}* y *fimH1* en el 97%, 9% y 82.4% de los aislamientos, respectivamente. Además, se observó que la prevalencia de estos genes fue menor en los aislados CRISPR positivos. Los perfiles de susceptibilidad muestran altos porcentajes de resistencia a ampicilina (91%), cefazolina, (41%), trimetoprima-sulfametoxazol (38%) y ciprofloxacina (32%), con la presencia de multidrogoresistencia en el 35.2% de los aislamientos. Estos porcentajes de resistencia se relacionaron con la ausencia del sistema CRISPR. La caracterización de los arreglos CRISPR permitió la identificación de nueve espaciadores únicos que coincidían con genomas de fagos o plásmidos.

La identificación de una posible asociación entre la presencia del sistema CRISPR y una menor resistencia a antibióticos sugiere un rol protector de estos sistemas contra la diseminación de genes de resistencia. Estos hallazgos aportan información valiosa para comprender mejor la epidemiología molecular detrás de la resistencia en aislamientos clínicos de Bucaramanga.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Maestría en Microbiología. Directora: Mayra Alejandra Machuca Pérez. PhD en Microbiología. Codirector: José Arturo Gutiérrez Triana. PhD en Ciencias Naturales

Abstract

Title: Genetic Diversity of CRISPR/Cas Systems as a Typing Tool in antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates*

Author: Laura Vargas Rodríguez**

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, CRISPR-Cas Systems, Drug Resistance, Molecular Typing.

Description: *Klebsiella pneumoniae* is known for having various antimicrobial resistance mechanisms, which can make treatment choices difficult. CRISPR/Cas Systems provides adaptative immunity against mobile genetic elements in prokaryotes. Over the last few years, this system has shown a role in antibiotic resistance mechanisms and plasmid dynamics in *K. pneumoniae*. This study aimed to determine the genetic variability of CRISPR arrays and their utility as a typing tool on antibiotic-resistant *K. pneumoniae* isolates from Bucaramanga, Colombia.

CRISPR array detection, classification, and sequencing were performed by conventional PCR and Sanger's sequencing method to establish a relationship between the presence of CRISPR, the antibiotic susceptibility test, and the prevalence of antibiotic resistance and virulence genes in 34 *K. pneumoniae* isolates.

CRISPR prevalence was 24% in all isolates, 9% were classified as I-E, and 15% were classified as I-E*. *bla_{SHV}*, *bla_{KPC}*, and *fimH1* were detected in 97%, 9%, and 82.4% of the isolates, respectively. Besides, we observed that the prevalence of these genes was lower in CRISPR-positive isolates. Antibiotic susceptibility testing results show high resistance rates to ampicillin (91%), cefazolin (41%), SXT (38%), and ciprofloxacin (32%), also 35.2% of the isolates were multidrug-resistant. These resistance rates were associated with the absence of CRISPR systems. The analysis of CRISPR arrays made it possible to identify nine distinct spacers that matched phage or plasmid genomes.

The discovery of a possible link between CRISPR/Cas systems and lower antibiotic resistance suggests that these systems may help stop the spread of antibiotic resistance genes. These findings provide valuable information to understand better the molecular epidemiology behind antibiotic resistance in Bucaramanga's isolates.

* Degree Work

** Faculty of Health. School of Microbiology. Master in Microbiology. Director: Mayra Alejandra Machuca Pérez. PhD in Microbiology. Codirector: José Arturo Gutiérrez Triana. PhD in natural sciences.

Introducción

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un fenómeno evolutivo que, a través de la generación de mutaciones o la adquisición de material genético exógeno, permite a un microorganismo evadir la acción de los agentes antimicrobianos (Ahmed et al., 2024). No obstante, el fenómeno natural de resistencia puede verse acelerado por factores epidemiológicos y biológicos (INS, 2022).

La diseminación de bacterias farmacorresistentes en el ambiente es una problemática mundial (CDC, 2019; OMS, 2021; OPS, 2021a). En América Latina, se ha documentado que las principales razones para la aparición de este fenómeno son el uso inadecuado y excesivo de antibióticos en el ámbito clínico y la falta de regulación en la distribución de los antimicrobianos (Ahmed et al., 2024; OMS, 2021; OPS, 2021b; Vanegas & Jiménez, 2020). La falta de actualización en los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de los patógenos circulantes, contribuye a esta práctica por parte del personal médico (Ahmed et al., 2024; Ayobami et al., 2022). Por esto, desde la investigación científica y la vigilancia epidemiológica, se hace necesario divulgar nuevo conocimiento sobre aspectos fundamentales como las características fenotípicas y moleculares de estos patógenos. La generación de esta información ayuda a la elección racional de un tratamiento empírico dirigido, que evite la generación de resistencia y optimice los costos (Khoshbakht et al., 2022; Y. Li et al., 2024).

Particularmente, las infecciones causadas por cepas de *K. pneumoniae* resistentes a antibióticos representan un peligro significativo para la salud pública. En todo el mundo, estas infecciones aumentan la tasa de mortalidad de los pacientes en unidades de cuidados intensivos (UCI) y aumentan los costos de hospitalización (Chang et al., 2021; Karampatakis et al., 2023). El notable aumento en la prevalencia de infecciones causadas por patógenos multidrogorresistentes

(MDR) y extremodrogoresistentes (XDR) pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* plantea un importante reto debido a la presencia natural de estas bacterias en la microbiota humana (Basnet et al., 2024; Navon-Venezia et al., 2017).

El estudio de los sistemas CRISPR bacterianos (del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* o palíndromos cortos regularmente interespaciados) ha avanzado notablemente en la última década, generando un creciente interés en la comunidad científica para estudiar la diversidad funcional de estos sistemas y su influencia en la resistencia a los antibióticos (Hu et al., 2023; Huang et al., 2017; Kamruzzaman & Iredell, 2020; Lin et al., 2016). Diferentes estudios han reportado la presencia de secuencias espaciadoras derivadas de genes de resistencia a los antibióticos en cepas de *K. pneumoniae* que albergan sistemas CRISPR (Mackow et al., 2019; Tang et al., 2020; Wang et al., 2020; Zhou et al., 2020). Asimismo, se ha observado la carencia de sistemas CRISPR en cepas de *K. pneumoniae* clon ST258 resistentes a los carbapenémicos (Hu et al., 2023). Lo anterior, sugiere una relación inversa entre la presencia de sistemas CRISPR y la susceptibilidad a los antibióticos en *K. pneumoniae* (Li et al., 2018; Mackow et al., 2019; Wang et al., 2020). Por lo tanto, la ausencia de sistemas CRISPR en este patógeno, permitiría la adquisición de elementos genéticos foráneos que pueden maximizar la supervivencia del organismo frente a los agentes antimicrobianos, a costa de aumentar su inestabilidad genómica e incrementar su vulnerabilidad a virus (Huang et al., 2017).

Teniendo en cuenta que la vigilancia epidemiológica se soporta en técnicas de tipificación de los microorganismos (G. Kumar et al., 2023), en este proyecto se desarrolló una estrategia de genotipificación basada en las regiones CRISPR de aislamientos de *K. pneumoniae* para aportar información a nivel regional de los perfiles de susceptibilidad antibiótica, junto con la identificación de genes de resistencia, respondiendo a la pregunta de investigación:

¿Cómo contribuyen los arreglos CRISPR a la tipificación molecular de aislamientos de *K. pneumoniae* resistentes a antibióticos en hospitales de Bucaramanga?

1. Objetivos

1.1.Objetivo General

Determinar la variabilidad genética de los arreglos CRISPR y su utilidad en la tipificación de aislados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos obtenidos en hospitales de Bucaramanga.

1.2.Objetivos Específicos

Determinar la prevalencia de los sistemas CRISPR en aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae*.

Establecer las relaciones entre el sistema CRISPR y el perfil de resistencia/susceptibilidad a antibióticos en los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*.

Evaluar la utilidad de la diversidad de los arreglos CRISPR como herramienta de tipificación en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*.

2. Marco conceptual

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

El género *Klebsiella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos no móviles, con reacciones catalasa positiva y oxidasa negativa (Abbas et al., 2024; Bengoechea et al., 2019). La mayoría de estas bacterias exhiben una cápsula de abundante polisacárido, característica que le confiere su principal factor de virulencia (Abbas et al., 2024; Wang et al., 2022). Es resistente a la ampicilina debido a la producción de una enzima β -lactamasa sulfhidrilo variable (SHV del inglés *Sulfhydryl Variable*) codificada cromosómicamente (Tsang et al., 2024). Dentro de este género existen varias especies, siendo las más frecuentes en aislados clínicos *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* (Wang et al., 2022).

K. pneumoniae es un patógeno que genera infecciones oportunistas asociadas a la atención en salud e infecciones adquiridas en la comunidad, como las infecciones del tracto urinario (ITU), la neumonía y la septicemia, con una alta prevalencia a nivel mundial (Huang et al., 2015; Osman et al., 2020; Wasfi et al., 2016; Zhang et al., 2021). Diferentes factores pueden estar involucrados en la virulencia y patogenicidad de esta bacteria, tales como: a) la cápsula, una matriz extracelular rica en polisacáridos que envuelve la bacteria y le proporciona protección contra la desecación en el ambiente, la actividad bactericida del suero y la fagocitosis por los macrófagos (Paczosa & Meccas, 2016). b) Las adhesinas, son apéndices de membrana también denominadas fimbrias que permiten la adherencia de la bacteria a las células del hospedero; *K. pneumoniae*, posee varias fimbrias, principalmente del tipo 1 que están codificadas por el gen *fimH*, y que se asocian con la patogénesis en las ITU (Cubero González, 2016). c) Los sideróforos, son proteínas secretadas que permiten la absorción de hierro como la enterobactina, la aerobactina, y la yersinabactina; estas

captan el hierro del medio a través de la quelación y lo introducen en la bacteria (Govindarajan & Kandaswamy, 2022; Karampatakis et al., 2023; Wasfi et al., 2016).

Dentro de esta especie, existe una variante hipervirulenta denominada hvKP (siglas en inglés *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae*), la cual genera gran preocupación a nivel mundial ya que causa infecciones asociadas a la atención en salud y adquiridas en la comunidad, potencialmente mortales en individuos sanos (Abbas et al., 2024; Huang et al., 2015; Varela, 2019; Wang et al., 2022). El éxito patogénico de hvKP se debe a la presencia de los factores de virulencia mencionados, así como la adquisición de genes que median la resistencia a los antimicrobianos (Abbas et al., 2024), lo que reduce las opciones terapéuticas disponibles y ocasiona el fracaso de la mayoría de tratamientos de primera línea (Abbas et al., 2024; Santajit & Indrawattana, 2016).

2.1.1. Resistencia a los antibióticos en *K. pneumoniae*

Las bacterias Gram negativas han desarrollado varios mecanismos de resistencia a través de los años, de manera simultánea a la introducción de nuevos antimicrobianos (Wasfi et al., 2016). Específicamente, *K. pneumoniae* ha cobrado relevancia en las últimas dos décadas debido la aparición de cepas resistentes a los carbapenémicos (CRKP del inglés *Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae*) con un 28.6% de prevalencia mundial (Lin et al., 2024; Osman et al., 2020). Los carbapenémicos son antibióticos del grupo de los betalactámicos, que cuentan con un amplio espectro de actividad antibacteriana, por lo cual se consideran la última línea de defensa y usualmente se reservan para el tratamiento de infecciones severas como ITU complicada, sepsis, meningitis e infecciones asociadas a la atención en salud (Lin et al., 2024).

Cabe destacar que pacientes con infecciones causadas por *K. pneumoniae* resistente a múltiples antibióticos, enfrentan un panorama clínico desalentador, ya que estas bacterias causan infecciones invasivas, con pocas opciones terapéuticas y de alta mortalidad (Karampatakis et al.,

2023; Wang et al., 2022). Adicionalmente, la diversidad genética de la CRKP está aumentando (Heng et al., 2024; Zhang et al., 2021). Actualmente, la mayoría de los aislados clínicos de CRKP pertenecen al clon ST258 y sus variantes, los cuales se distribuyen en el mundo causando numerosos brotes hospitalarios, haciendo que la investigación en el ámbito clínico sea prioritaria (Heng et al., 2024).

Los genes de resistencia, además de encontrarse en el cromosoma bacteriano, también se localizan en plásmidos, lo que permite su transferencia horizontal a otros patógenos y la rápida diseminación geográfica (Abbas et al., 2024). Un ejemplo de esto es la transferencia plasmídica del gen *bla_{KPC}* que codifica para la carbapenemasa KPC (por sus siglas en inglés *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), la cual confiere resistencia contra carbapenémicos y cefalosporinas de tercera generación (Han et al., 2024). Actualmente es la más diseminada a nivel mundial y países como Colombia (69.1% – 70.1%) (Rada et al., 2019; Saavedra et al., 2021), China (78.2%) (C. Li et al., 2024) y Puerto Rico (17.5%) (Forero-Hurtado et al., 2023) son endémicos para la KPC (Cadena et al., 2024; Ghasemnejad et al., 2019). La transferencia horizontal de genes es uno de los mecanismos más exitosos para la transmisión de la multidrogoresistencia (MDR) entre patógenos bacterianos (Jhalora et al., 2024). La creciente aparición de aislados clínicos de *K. pneumoniae* MDR es preocupante y conlleva a la limitación en las opciones terapéuticas para el tratamiento de estas infecciones (Abbas et al., 2024; Heng et al., 2024).

2.1.2. Caracterización molecular de *K. pneumoniae*

La caracterización molecular de patógenos como *K. pneumoniae* se fundamenta en el análisis del material genético y de marcadores moleculares con el propósito de comprender la diversidad genética de las cepas y su relación con factores de virulencia y resistencia antimicrobiana (Falco et al., 2017; Kashefieh et al., 2024; S. Kumar et al., 2023). En el ámbito de

la microbiología clínica y la epidemiología molecular, esta estrategia ha demostrado ser esencial para la identificación precisa de los patógenos, el establecimiento de relaciones entre el genotipo y el fenotipo, y la implementación de medidas de control y vigilancia epidemiológica (Kashefieh et al., 2024; S. Kumar et al., 2023).

La importancia de la caracterización molecular radica en su capacidad para diferenciar cepas dentro de una misma especie, permitiendo la detección de clones epidémicos, la reconstrucción de rutas de transmisión y la evaluación de la efectividad de las estrategias de control de infecciones (S. Kumar et al., 2023; Mestrovic et al., 2022). En el caso de *K. pneumoniae*, un patógeno oportunista de relevancia clínica, este enfoque resulta particularmente crítico debido a su creciente resistencia a los antibióticos y su implicación en infecciones tanto hospitalarias como comunitarias (Lin et al., 2024). La posibilidad de establecer correlaciones entre características genéticas y mecanismos de resistencia facilita el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de prevención, contribuyendo a la mitigación del impacto de cepas multirresistentes (Kashefieh et al., 2024; Mestrovic et al., 2022; Salmanov et al., 2023).

Para el estudio de la estructura poblacional de *K. pneumoniae*, se han desarrollado diversas metodologías de tipificación molecular, cada una con aplicaciones específicas según el nivel de resolución requerido (S. Kumar et al., 2023). Entre estas, la electroforesis en campo pulsado (PFGE del inglés *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) ha sido ampliamente utilizada para la diferenciación de cepas en estudios epidemiológicos, debido a su capacidad para generar perfiles genéticos comparables a nivel clonal (Pruss et al., 2025). No obstante, en el caso de *K. pneumoniae*, no proporciona suficiente resolución debido a la alta clonalidad de los aislados clínicos y la baja potencia de este método para diferenciar entre clusters (S. Kumar et al., 2023). La tipificación multilocus de secuencias (MLST del inglés *Multi-Locus Sequence Typing*) ha demostrado ser una

herramienta robusta para la clasificación filogenética de cepas (S. Kumar et al., 2023). Esta se basa en la secuenciación de genes conservados que reflejan la evolución del patógeno y permite la identificación de los clones y su distribución, así como su relación con brotes infecciosos (Ma et al., 2024). A pesar de su utilidad en la caracterización de aislamientos bacterianos, el MLST presenta limitaciones importantes, entre ellas su complejidad metodológica, el tiempo requerido para su ejecución y los altos costos que implica, factores que dificultan su implementación en entornos con recursos limitados (Wen et al., 2020).

El uso complementario de estas estrategias ha permitido una caracterización más precisa de la diversidad genética de *K. pneumoniae*, favoreciendo el estudio de su evolución y la identificación de clones de alto riesgo (Salmanov et al., 2023; Sedrakyan et al., 2025). En consecuencia, la caracterización molecular se consolida como una herramienta indispensable en el monitoreo y control de este patógeno, proporcionando información clave para la toma de decisiones en salud pública y el desarrollo de enfoques terapéuticos más efectivos (Karampatakis et al., 2023).

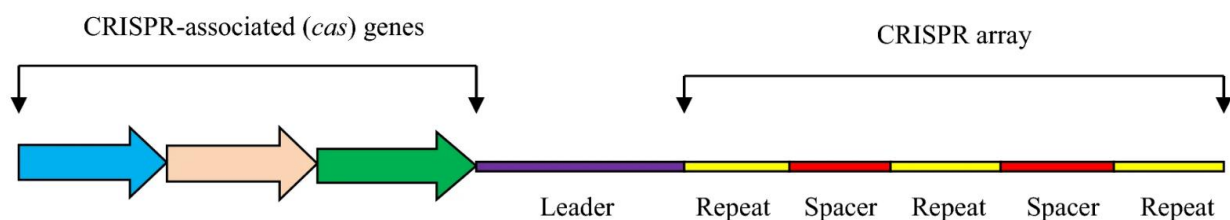
2.2.Sistemas CRISPR/Cas

Las bacterias y arqueas han desarrollado diversos mecanismos de defensa, para evitar la infección por elementos genéticos móviles, entre los que se encuentra el sistema de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas (CRISPR del inglés, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) y las proteínas asociadas a CRISPR (Cas del inglés *CRISPR-associated proteins*), denominado Sistema CRISPR/Cas (Kadkhoda et al., 2025; Kadkhoda et al., 2024; Makarova et al., 2011). Este sistema proporciona inmunidad adaptativa hereditaria, específica contra los elementos genéticos invasores (Medina et al., 2018; Montazeri et al., 2024), mediante la generación de memoria inmune almacenada en forma de secuencias

espaciadoras derivadas de genomas extraños y que son insertadas en el locus CRISPR (Kadkhoda et al., 2024; Koonin et al., 2017; Medina et al., 2018). El sistema consiste en un conjunto de proteínas Cas, denominado *modulo efector*, con dominios funcionales de nucleasas, helicasas y proteínas de unión a polinucleótidos (Koonin et al., 2017; Makarova et al., 2011; Montazeri et al., 2024). Enseguida a este módulo se encuentra el arreglo CRISPR, compuesto de una secuencia líder no codificante rica en A/T, y una serie intercalada de secuencias palindrómicas repetitivas idénticas de aproximadamente 30 pb (DR del inglés *Direct Repeats*), separadas por secuencias únicas de tamaño similar denominadas espaciadores (Figura 1) (Kushwaha et al., 2023; Medina et al., 2018). La arquitectura genómica del locus CRISPR presenta una notable variabilidad entre las diversas especies bacterianas, lo que permite su clasificación en diferentes clases y tipos, evidenciando la especialización en los mecanismos de defensa adaptativa (Kadkhoda et al., 2025; Makarova et al., 2015).

Figura 1.

Arquitectura genómica del locus CRISPR en procariontas



Nota. Representación gráfica de los elementos que conforman el Sistema CRISPR/Cas. Tomado de *A glance at genome editing with CRISPR–Cas9 technology* (p. 449), por (Barman et al., 2019), Current Genetics.

El locus CRISPR, se puede encontrar en diferentes regiones del cromosoma bacteriano o en plásmidos, y su ubicación específica es variable (Makarova et al., 2015; Xue & Sashital, 2019).

En el contexto de las enterobacterias, el sistema CRISPR/Cas en el cromosoma bacteriano se localiza específicamente en la región comprendida entre el gen de la reductasa de fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (*cysH*) y el gen de la proteína de conversión de isoenzimas de fosfatasa alcalina (*iap*). (Xue & Sashital, 2019; Zhou et al., 2020). En algunas enterobacterias se ha identificado un sistema CRISPR/Cas de tipo IV-A presente exclusivamente en plásmidos *IncHI1B/IncFIB* (Kamruzzaman & Iredell, 2020; Newire et al., 2020). Asimismo, en cepas de *K. pneumoniae* aisladas de perros, gatos, ovejas y erizos, se ha detectado un sistema CRISPR/Cas tipo III en el plásmido de multiresistencia *pENVA* (Medina et al., 2018).

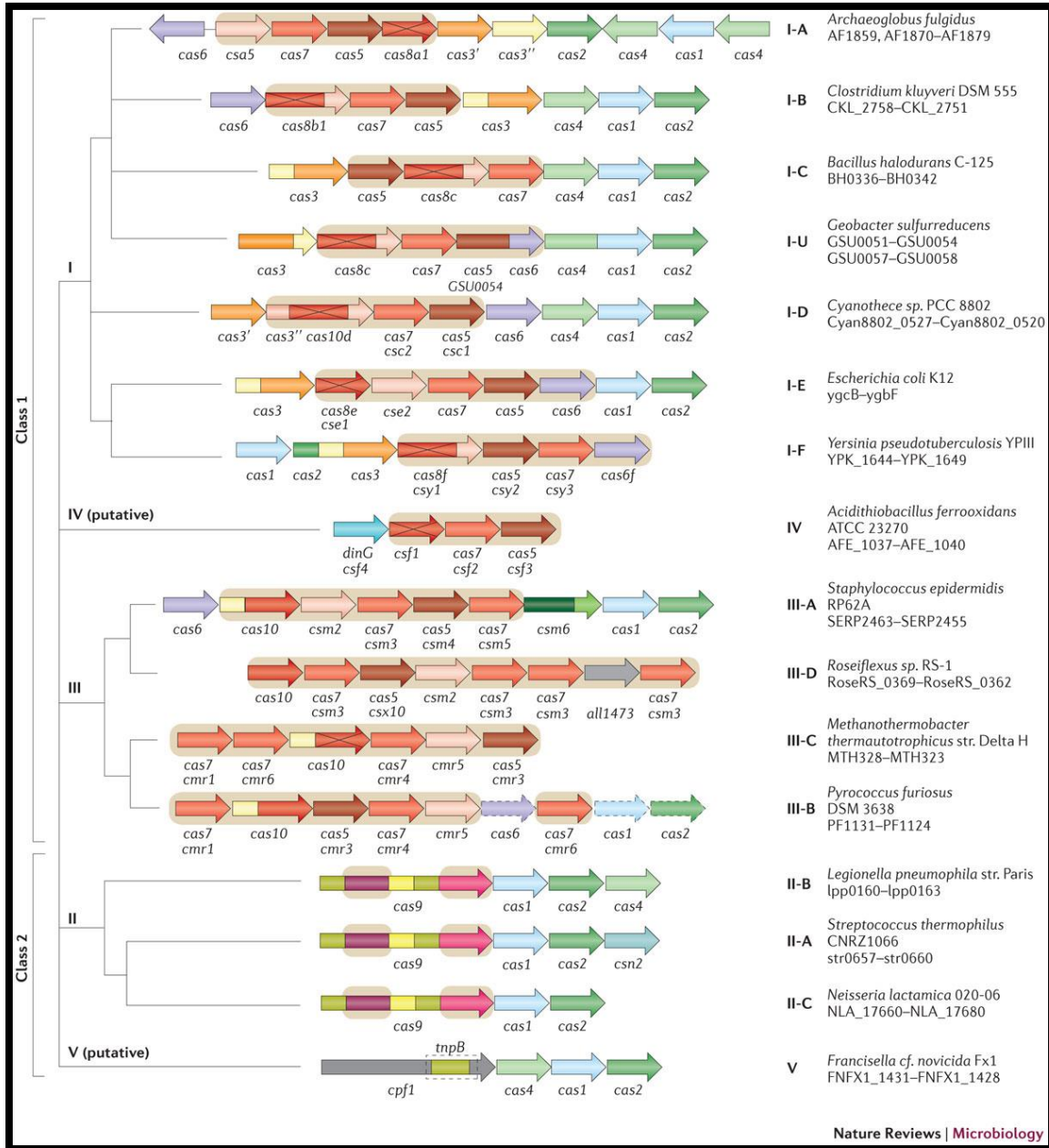
Funcionalmente, CRISPR es un mecanismo programable de inmunidad con la capacidad de reconocer y destruir material genético de virus invasores (bacteriófagos) o plásmidos. (Koonin et al., 2017; X. Li et al., 2024). No obstante, CRISPR, como cualquier sistema de defensa, está involucrado en una competencia constante con los virus, lo que resulta en una rápida evolución de los genes *cas* y una notable diversidad de los repertorios genéticos y arquitecturas del locus CRISPR, permitiendo la diversificación de los mecanismos de defensa (Koonin et al., 2017; Kushwaha et al., 2023). Más específicamente, se sugiere que la diversificación viene impulsada por la coevolución competitiva con proteínas anti-CRISPR codificadas por virus (Koonin et al., 2017; X. Li et al., 2024; Shen et al., 2017).

El número y diversidad de sistemas CRISPR identificados en genomas secuenciados está aumentando rápidamente (Kadkhoda et al., 2025; Shelenkov et al., 2025). Es por esto, que se ha adoptado un enfoque múltiple para la clasificación de CRISPR, que tiene en cuenta los genes *cas* característicos y específicos para los tipos y subtipos individuales de CRISPR (Koonin et al., 2017; Makarova et al., 2015). La aplicación combinada de estos criterios dio lugar al esquema de clasificación adoptado actualmente. Los sistemas CRISPR se pueden clasificar en 2 grandes clases,

la Clase 1 se caracteriza por utilizar un complejo efector de CRISPR-RNA (crRNA) para la inmunidad constituido de múltiples subunidades (Koonin et al., 2017; Makarova et al., 2011; Makarova et al., 2015). Los miembros de esta clase son los sistemas Tipo I, Tipo III y Tipo IV, que se caracterizan por la presencia de los genes *cas3*, *cas10* y *csf1*, respectivamente (Koonin et al., 2017; Makarova et al., 2011; Makarova et al., 2015). Los sistemas se organizan, a su vez, en subtipos basándose en la firma de genes *cas* específicos. El Tipo I se organiza en los subtipos I-A, I-B, I-C, I-D, I-E, I-F y I-U, mientras que el Tipo III comprende los subtipos III-A, III-B, III-C y III-D, y para el Tipo IV aún no se han descrito subtipos (Cui & Qu, 2024; Medina et al., 2018). La Clase 2, la cual emplea una sola proteína efectora y un tracr-ARN para realizar las funciones de inmunidad, está compuesta por los sistemas Tipo II, Tipo V y Tipo VI, cuyos genes emblemáticos son *cas9*, *cpf1* (*cas12*) y *cas13*, respectivamente (Cui & Qu, 2024; Koonin et al., 2017; Makarova et al., 2011; Makarova et al., 2015). El Tipo II se divide en tres subtipos (II-A, II-B y II-C), el Tipo V contiene seis subtipos (V-A, V-B, V-C, V-D, V-E y V-U), y el Tipo VI está compuesto por los subtipos VI-A, VI-B1, VI-B2 y VI-C (Cui & Qu, 2024; Medina et al., 2018). La arquitectura específica del módulo efector para cada tipo de sistema CRISPR se muestra en la Figura 2.

Figura 2

Arquitectura del módulo efector de los sistemas CRISPR

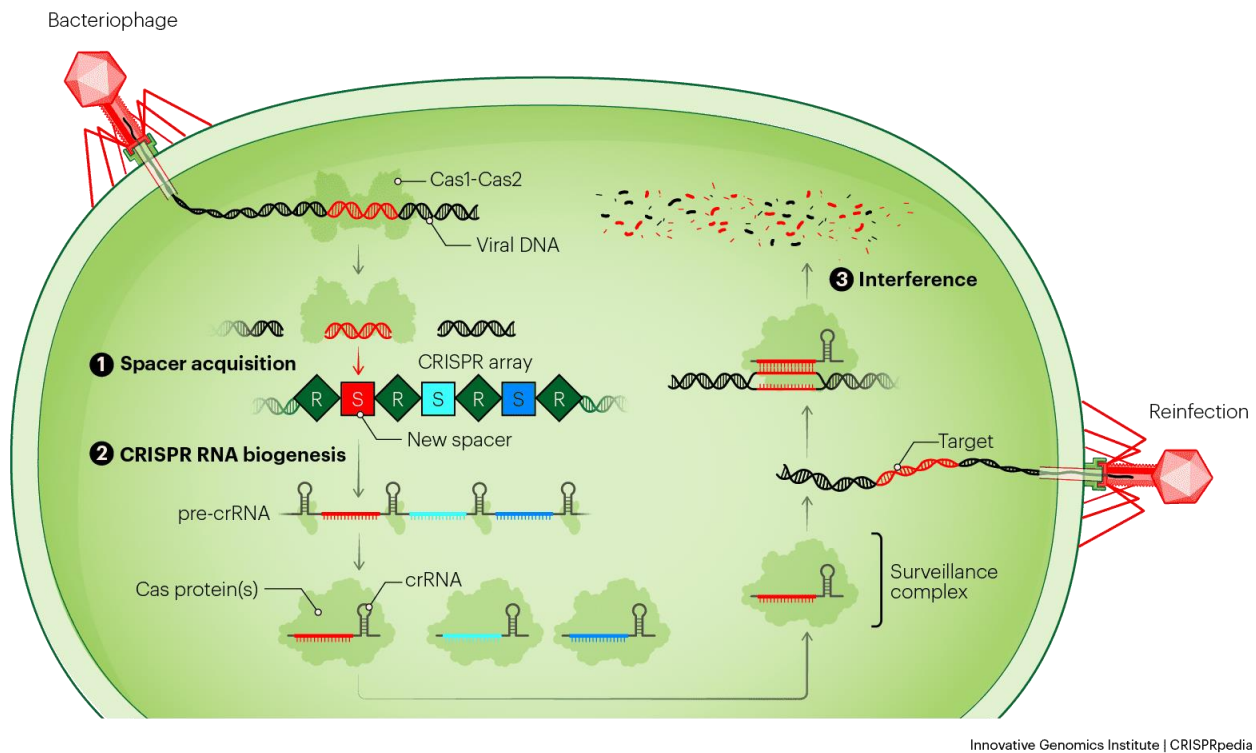


Nota: Se muestra la organización típica del conjunto de genes efectores (*cas*) en los diferentes subtipos de sistemas CRISPR/Cas. Además, se muestran las especies representativas para cada subtipo del sistema. Los genes homólogos están codificados por colores y se identifican mediante un nombre de familia (*cas6*, *cas3*, *cas10*, etc.). Tomado de (Makarova et al., 2015).

El mecanismo de inmunidad mediada por el sistema CRISPR ocurre en 3 etapas: adaptación, expresión e interferencia (Figura 3) (Makarova et al., 2011; Medina et al., 2018; Montazeri et al., 2024).

Figura 3

Etapas del proceso de inmunidad mediada por CRISPR en procariontas



Nota. Tomado de *CRISPR en la naturaleza*, por (Doudna, 2022). Innovative Genomics Institute, Universidad de California, Berkeley. Recuperado de: <https://innovativegenomics.org/crisprpedia/crispr-in-nature/>

Durante la etapa de **adaptación**, se integran en el locus CRISPR fragmentos de ADN pertenecientes a regiones del genoma de virus o a plásmidos. Cada evento de integración va acompañado de la duplicación de una repetición palindrómica, creando así una nueva unidad de espaciador-DR (Kushwaha et al., 2023; Medina et al., 2018). En la etapa de **expresión**, se genera

el transcrito primario del locus CRISPR (pre-ARNcr), el cual se procesa en ARNcr cortos mediante endorribonucleasas (Muzyukina & Soutourina, 2024). La etapa de **interferencia**, los ARNcr forman un complejo con las proteínas efectoras Cas, junto con las cuales patrullan el citoplasma celular en busca de detectar las secuencias diana complementarias de nuevos virus o plásmidos que coincidan con los espaciadores (Medina et al., 2018; Montazeri et al., 2024). Aunque actualmente no se ha identificado el mecanismo preciso de adquisición de espaciadores, se cree que el reconocimiento de estas secuencias diana en el ADN invasor, está mediado por la selección de precursores de espaciadores (protoespaciadores) a partir del reconocimiento de motivos adyacentes a protoespaciadores, exclusivos del ADN invasor (PAM del inglés *Protospacer Adjacent Motif*) (Lin et al., 2016). Los PAM desempeñan un papel importante en el proceso de reconocimiento de material genético exógeno (Kadkhoda et al., 2025; Makarova et al., 2011; Montazeri et al., 2024).

2.3. Sistemas CRISPR/Cas en *K. pneumoniae*

El estudio de los sistemas CRISPR/Cas en *K. pneumoniae* ha experimentado notables avances en la última década, lo que ha llevado al descubrimiento de nuevas proteínas efectoras, arquitecturas de locus y mecanismos moleculares innovadores (Koonin et al., 2017; Shelenkov et al., 2025; Xue & Sashital, 2019). Estos avances han generado un creciente interés en la diversidad funcional de estos sistemas y su influencia en la resistencia a los antibióticos (Han et al., 2024; Hu et al., 2023; Huang et al., 2017; Kamruzzaman & Iredell, 2020; X. Li et al., 2024; Lin et al., 2016).

Diferentes estudios describen la presencia de sistemas CRISPR funcionales en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*, particularmente en el clon de alto riesgo ST258 (Mackow et al., 2019; Tang et al., 2020; Wang et al., 2020; Zhou et al., 2020). Por el contrario, diversos estudios han evidenciado la ausencia del sistema CRISPR en aislamientos de *K. pneumoniae*, especialmente en

clones epidémicos como ST258/CC258, facilita la adquisición de plásmidos portadores de genes de resistencia antibiótica, en particular de los plásmidos *IncF* que contienen el gen de resistencia *bla_{KPC}* (Mackow et al., 2019; Tang et al., 2020; Wang et al., 2020; Zhou et al., 2020). Además, se propone una correlación inversa entre la presencia del sistema CRISPR y la resistencia a múltiples fármacos, ya que este sistema puede inhibir la adquisición y estabilidad de plásmidos gracias a la presencia de secuencias espaciadoras compatibles con plásmidos portadores de múltiples genes de resistencia (Wang et al., 2020; Zhou et al., 2020), lo que indica que este sistema puede actuar como una barrera contra la incorporación de genes de resistencia a los antibióticos (Basnet et al., 2024; Kadkhoda et al., 2025; Lin et al., 2024; Montazeri et al., 2024; Wang et al., 2020).

Otro aspecto relevante de los sistemas CRISPR/Cas en *K. pneumoniae* es la compleja relación que presentan con la adquisición de plásmidos de resistencia. En particular, los plásmidos *IncFII* portadores del gen *bla_{KPC-2}* fueron identificados en aislamientos ST15 con CRISPR/Cas de tipo I-E*, lo que sugiere que, bajo ciertas condiciones, los mecanismos de defensa bacterianos no logran impedir la adquisición de plásmidos de resistencia (Hu et al., 2023). Por otro lado, se ha descrito la presencia del sistema CRISPR/Cas de tipo IV-A3 exclusivamente en plásmidos *IncHI1B/IncFIB* de la familia *Enterobacteriaceae* (Newire et al., 2020). Este sistema contiene espaciadores dirigidos contra *traL*, un gen involucrado en la transferencia genética (Hu et al., 2023). Por ende, los aislamientos de *K. pneumoniae* que cuentan con este sistema pierden la habilidad para obtener plásmidos de la clase *IncFIIK/IncFIB(K)* (Newire et al., 2020; Shankar et al., 2022). Lo anterior sugiere que el sistema CRISPR/Cas de tipo IV-A3 no solo puede restringir la adquisición de plásmidos de resistencia, sino también modular la competencia entre elementos genéticos móviles dentro de la célula (Hu et al., 2023; Newire et al., 2020; Shankar et al., 2022).

En conjunto, estos hallazgos indican que los sistemas CRISPR/Cas desempeñan un papel significativo en la resistencia antibiótica, la patogenicidad y la dinámica de plásmidos en *K. pneumoniae*. A pesar de los avances, se requieren más investigaciones para comprender la diversidad genética y los mecanismos moleculares subyacentes a la patogenicidad y resistencia en *K. pneumoniae*. Conocer la caracterización genética y epidemiología en este patógeno permite desarrollar estrategias efectivas que aborden el problema de la resistencia a los antibióticos en *K. pneumoniae*.

3. Metodología

En este estudio se detectó, clasificó y secuenció el locus CRISPR en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* resistente a antibióticos y se describieron sus características genotípicas y fenotípicas. Para ello se realizó un estudio descriptivo y correlacional, de tipo transversal que incluyó aislamientos de *K. pneumoniae* obtenidos de pacientes con infecciones del tracto urinario y abscesos en piel atendidos en el E.S.E Hospital Universitario de Santander, la Clínica Materno Infantil San Luis y el Laboratorio Clínico UIS.

3.1. Aislamientos clínicos y cepas de referencia

La recolección, el procesamiento, aislamiento primario, e identificación de los aislamientos se realizó previamente como parte del proyecto 2708 “*Caracterización de los aislamientos bacterianos asociados a infección del tracto urinario en pacientes pediátricos*” durante agosto de 2020 y agosto de 2022, a través de un muestreo por conveniencia, en tres centros de atención en salud ubicados en Bucaramanga, Santander.

Se utilizaron las cepas de referencia de *K. pneumoniae* ATCC 700603, ATCC BAA 1705, y de *E. coli* ATCC 25922, cuyas características se describen en la Tabla 1. Los aislamientos y las cepas de referencia fueron criopreservados en caldo BHI (brain-heart infusion) con glicerol al 20%

a -80°C. Para la confirmación de especie y determinación de los patrones de resistencia de los aislamientos se empleó el sistema semi automatizado DL-96 y la PCR para la amplificación del espaciador transcripcional interno (ITS del inglés *Internal Transcribed Spacer*) 16s - 23s rDNA, específico de *K. pneumoniae*, los iniciadores se describen en la Tabla 2 (Osman et al., 2020).

Tabla 1

Características genotípicas y fenotípicas de las cepas de referencias utilizadas en el estudio

Cepa bacteriana	Características	
	Genotípicas	Fenotípicas
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA 1705	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	Resistente a FOX, CTX, CRO, CAZ, TZP, AMP, ETP, IMP, MEM, AK, LEV, F, SXT
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>bla_{SHV}</i>	Resistente a CTX, CRO, CAZ, SXT
<i>E. coli</i> ATCC 25922	No porta genes de resistencia	Sensible a antibióticos

Nota. Los antibióticos mostrados en la tabla corresponden a cefoxitina (FOX), cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO), ceftazidima (CAZ), piperacilina tazobactam (TZP), ampicilina (AMP), ertapenem (ETP), imipenem (IMP), meropenem (MEM), amikacina (AK), levofloxacina (LEV), nitrofurantoína (F), trimetoprima-sulfametoxazol (SXT).

3.2. Extracción de ADN

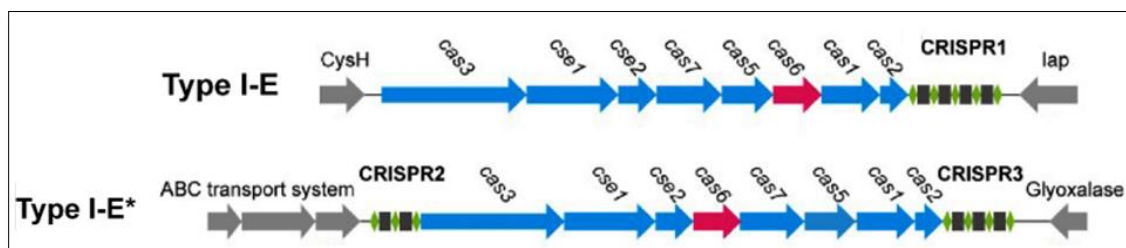
El ADN total bacteriano se extrajo a partir de un cultivo en fase estacionaria (24 horas, 37°C) en 3 ml de caldo BHI, utilizando el Monarch Genomic DNA Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN extraído se determinó por espectrofotometría (260/280nm).

3.3. Detección molecular del locus CRISPR

La prevalencia del locus CRISPR en los aislamientos se determinó por medio de una PCR convencional con la amplificación de los genes conservados *cas1* y *cas3*, cuyo patrón de amplificación permite la detección y clasificación del locus CRISPR en tipo I-E o I-E*, según lo reportado en la literatura por Zhou et al., 2020 (Figura 4).

Figura 4

Arquitectura del locus CRISPR según el tipo de sistema identificado



Nota. Se presenta la arquitectura de los sistemas CRISPR correspondientes a los tipos I-E y I-E*. Los genes *cas* se representan como flechas de distintos colores. Los rombos verdes indican repeticiones directas (DR) y los rectángulos grises oscuros son espaciadores, en conjunto estos simbolizan los locus *CRISPR1*, *CRISPR2* y *CRISPR3*. Tomado y modificado de Zhou et al., 2020.

Los iniciadores y las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 2 (Zhou et al., 2020). Para este estudio, los iniciadores se evaluaron en las secuencias de referencia del NCBI (del inglés, *National Center for Biotechnology Information*) *K. pneumoniae* strain KpIM03_1 (N° acceso: NZ_CP076110) y *K. pneumoniae* strain 36 (N° acceso: NZ_CP132964.1). El sistema CRISPR I-E se encontró entre los genes *cysH* – *iap*, y el sistema I-E* se encontró entre los genes del sistema de transporte ABC – Glioxalasa, como se describe en la literatura (Xue & Sashital, 2019; Zhou et al., 2020).

3.4. Diseño de iniciadores para la amplificación y secuenciación de los arreglos CRISPR

Para la amplificación y secuenciación de los arreglos *CRISPR1* y *CRISPR2* en los aislamientos de *K. pneumoniae* que poseían el sistema CRISPR, se diseñaron iniciadores específicos utilizando secuencias de referencia previamente caracterizadas con los sistemas CRISPR tipo I-E (KpIM03_1) y I-E* (strain 36), obtenidas de las bases de datos *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Las secuencias fueron introducidas en la herramienta Primer-BLAST del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para generar los iniciadores de PCR según los parámetros estándar de diseño, tales como temperatura de fusión (T_m) entre 55 °C y 65 °C, tamaño entre 18 y 25 nucleótidos, y porcentaje de contenido GC entre el 40 % y el 60 %. La región reconocida por los iniciadores fue verificada utilizando el software *SnapGene* (<https://www.snapgene.com/>), identificándose el sitio de hibridación en los locus de referencia de CRISPR en *K. pneumoniae*.

Posteriormente, la validación experimental incluyó la amplificación de los arreglos CRISPR mediante PCR de punto final; las condiciones de amplificación utilizadas fueron tomadas de un estudio realizado por Díez *et al.*, 2010 y adaptadas a las características de los iniciadores diseñados en este estudio (Díez *et al.*, 2010) (Tabla 2). Los productos amplificados fueron purificados utilizando el Monarch PCR & DNA Cleanup Kit, siguiendo las indicaciones del fabricante. La secuenciación se realizó mediante la técnica de Sanger en la compañía GENCELL, (Bogotá) empleando los mismos iniciadores diseñados para la PCR.

Para garantizar la calidad y fiabilidad de las secuencias obtenidas mediante la metodología de Sanger, se realizó un proceso de evaluación detallado en *Snapgene* que incluyó la identificación de zonas de alta y baja calidad, así como la aplicación de la escala *Phred* para determinar la exactitud de cada base nucleotídica (Ewing *et al.*, 1998). Se consideraron de alta calidad aquellas

regiones con picos bien definidos, sin solapamiento de señales y con una separación clara entre bases adyacentes. Por otro lado, se identificaron como zonas de baja calidad aquellas con picos difusos, superposición de colores y baja intensidad de fluorescencia. Además, se determinaron confiables aquellas bases con un valor *Phred* igual o superior a 20, ya que presentan una probabilidad de error del 1% o menor. Para bases con valores inferiores, se realizó una inspección manual y, cuando fue necesario, se descartaron o corrigieron mediante edición manual.

Las secuencias de los arreglos CRISPR se identificaron a través del software *CRISPRFinder* (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>), el cual permite la localización de secuencias DR de 23-55 pb separadas por secuencias variables o espaciadores de 25-60 pb. Los espaciadores de los arreglos CRISPR se extrajeron de los resultados de *CRISPRFinder*. Finalmente, se analizó la identidad de cada uno de los espaciadores en *GenBank* mediante la función BLASTn, de nucleótidos.

3.5.Detección molecular de bla_{SHV} y bla_{KPC} y fimH_1

La detección de los determinantes de virulencia y resistencia en los aislamientos se realizó mediante PCR de punto final, utilizando los iniciadores y condiciones de amplificación descritas en la Tabla 2 (Abduljabbar et al., 2016; Bravata et al., 2019; Zhou et al., 2020). Se detectó un determinante de virulencia [la proteína de adhesión fimbria tipo I (*fimH_1*)], y dos genes de resistencia [*bla_{SHV}* y *bla_{KPC}*], que codifican para una betalactamasa y una carbapenemasa, respectivamente. Estos genes se han encontrado en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* previamente (Abduljabbar et al., 2016; Bina et al., 2015; Poirel et al., 2011). Los productos amplificados fueron evaluados en geles de agarosa al 2%, teñidos con SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen™) para su visualización y fotografía usando el sistema de documentación de geles ChemiDoc™ Imaging Systems (BioRad).

3.6. Determinación del perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos

Para la determinación del perfil de susceptibilidad a los antibióticos, se empleó el sistema semi automatizado DL-96-E ID/AST distribuido por Vélez Lab, el cual permite determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC del inglés *Minimum Inhibitory Concentration*) a diferentes antibióticos según las recomendaciones del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI del inglés *Clinical and Laboratory Standard Institute*) (CLSI, 2023). Se evaluó la susceptibilidad frente a 16 antibióticos: cefazolina, gentamicina, ampicilina, cefuroxima, cefepima, ceftriaxona, piperacilina tazobactam, ampicilina sulbactam, meropenem, imipenem, amikacina, trimetoprima-sulfametoxazol, levofloxacina, ciprofloxacina, ceftazidima, y nitrofurantoína.

3.7. Análisis estadístico

A partir de la base de datos construida con los resultados obtenidos se utilizó el software estadístico R para determinar la prevalencia del locus CRISPR, los perfiles de susceptibilidad antibiótica, los determinantes de resistencia y virulencia. La correlación entre las distintas combinaciones de genes de resistencia, virulencia y el sistema CRISPR se calculó utilizando el test Exacto de Fisher, teniendo en cuenta las características de las variables evaluadas. Adicionalmente, se utilizó el software R Studio para diseñar las gráficas de resultados.

3.8. Aspectos éticos

Este proyecto se desarrolló posterior a su aprobación por parte del Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI) según el Acta N° 13 de 2024.

Tabla 2

Iniciadores y condiciones de amplificación para la detección de los genes de interés para el estudio

Gen	Descripción	Iniciador	Secuencia iniciadores	Producto amplificado (pb)	Condiciones de amplificación	Referencia
Confirmación de la especie						
<i>16s-23s rDNA</i>	Espaciador transcripcional interno 16s-23s rDNA, específico de <i>K. pneumoniae</i>	Pf	5'-ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT-3'	130	Desnaturalización; 94°C por 10 min. 35 ciclos de 94°C por 30 s, 57°C por 20 s, 72°C por 20 s. Extensión; 72°C por 10 min	(Osman et al., 2020)
		Pr1	5'-TTCACCTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC-3'	260		
		Pr2	5'-CCGAAGATGTTTCACTTCTGATT-3'			
Detección CRISPR						
<i>cas1</i>	CRISPR	cas1_F	5'-CTTTTGGCACGACGGAATCA-3'	341	Desnaturalización; 95°C por 2 min. 30 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 40 s, 72°C por 1 min. Extensión; 72°C por 5 min	(Zhou et al., 2020)
		cas1_R	5'-TGGCGCTGGATGATGATTTG-3'	598		
cas3_F		5'-GTCCCGACTAAAATGCGTCC-3'	598			
cas3_R		5'-CGTTGATGGCGGTGATGAAT-3'				
<i>cas3</i>						
Arreglos CRISPR						
<i>CRISPR1</i>	Arreglos CRISPR	KpLM03_F	5'-GCCGACCTGTTGCCATATAAATCAC-3'	Variable	Desnaturalización inicial; 94°C por 30 s. 10 ciclos de 94°C por 15 s, 65°C por 1 min, 68°C por 2 min. 10 ciclos de 94°C por 15 s, 62°C por 1 min, 68°C por 2 min. 15 ciclos de 94°C por 15 s, 60°C por 1 min, 68°C por 2 min. Extensión final; 68°C por 5 min	(Díez et al., 2010)
		KpLM03_R	5'-CAGCAGGTGATACAGCTAAGTGACG-3'			
36cas2_F		5'-AACCGTTGTTGATTACCTGTTGCAG-3'				
36cas2_R		5'-TAGCTACGTTGCCTTCGTTTCATAGG-3'				
<i>CRISPR2</i>						

Gen	Descripción	Iniciador	Secuencia iniciadores	Producto amplificado (pb)	Condiciones de amplificación	Referencia
Determinantes de resistencia						
<i>bla_{SHV}</i>		blaSHV_F blaSHV_R	5'- GATGAACGCTTTCCCATGATG-3' 5'-CGCTGTTATCGCTCATGGTAA-3'	214	Desnaturalización; 94°C por 4 min. 30 ciclos de 94°C por 30 s, 59°C por 30 s, 72°C por 1 min. Extensión; 72°C por 5 min	(Bravata et al., 2019)
<i>bla_{KPC}</i>	Resistencia a antibióticos β-lactámicos	blaKPC_F blaKPC_R	5'- TCGCTAAACTCGAACAGG -3' 5'-TTACTGCCCCGTTGACGCCCAATCC-3'	785	Desnaturalización; 94°C por 2 min. 30 ciclos de 94°C por 1 min, 56.5°C por 30 s, 72°C por 1 min. Extensión; 72°C por 5 min	(Zhou et al., 2020)
Determinante de virulencia						
<i>fimH_1</i>	Fimbria tipo I (adhesina)	Fimh1_F Fimh1_R	5'- ATGAACGCCTGGTCCTTTGC-3' 5'- GCTGAACGCCTATCCCCTGC-3'	688	Desnaturalización; 94°C por 4 min. 30 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 40 s, 72°C por 60 s. Extensión; 72°C por 10 min	(Abduljabbar et al., 2016)

Nota. Elaboración propia.

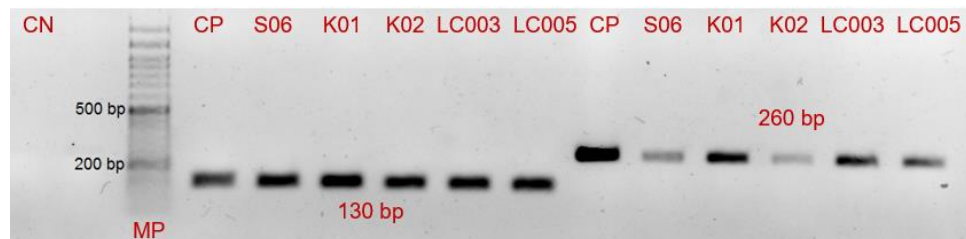
4. Resultados

4.1. Recolección de aislamientos clínicos

Un total de 34 aislamientos de *K. pneumoniae* fueron recolectados entre agosto de 2021 y junio de 2024 en 3 centros de atención en salud de Bucaramanga: E.S.E Hospital Universitario de Santander, Clínica Materno Infantil San Luis y Laboratorio Clínico UIS. De los 34 aislamientos, 33 son procedentes de infecciones del tracto urinario y uno (1) de ulcera en piel. Todos los aislamientos fueron confirmados como *K. pneumoniae* mediante la amplificación del ITS 16s-23s rDNA (Figura 5).

Figura 5

Amplificación del ITS 16S-23S rDNA específico para K. pneumoniae.



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados por PCR de punto final del ITS **16S-23S** rDNA específico de *K. pneumoniae*, de 130 pb o 260 pb. Se utilizaron las cepas de referencia *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 como control positivo (CP) y *E. coli* ATCC 25922 como control negativo (CN) en todas las corridas. Los aislamientos clínicos evaluados corresponden a los códigos S06 – LC005. MP corresponde al marcador de peso molecular ExcelBand™ 100 bp+3K DNA Ladder.

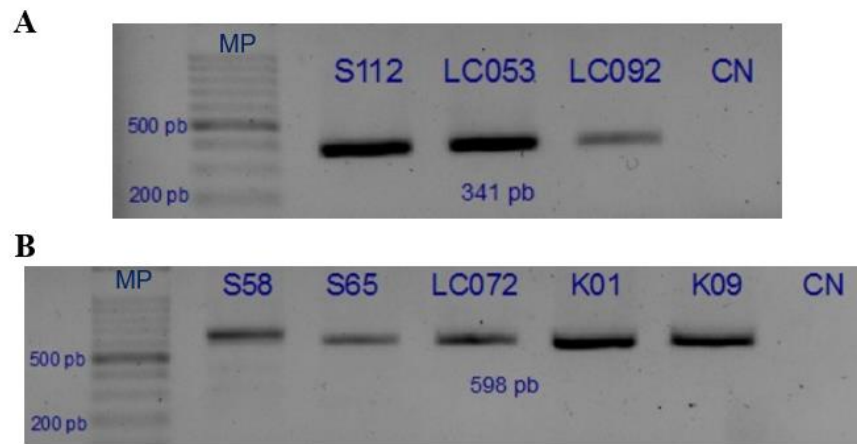
4.2. Prevalencia de los sistemas CRISPR en los aislamientos clínicos

El sistema CRISPR fue identificado a partir de la amplificación de los genes *cas1* y *cas3* (Figura 4), los cuales además permiten clasificar los tipos de sistema CRISPR presente en los

aislamientos evaluados. Se encontró que el 24% (8/34) de los aislamientos contienen el sistema CRISPR, de los cuales el 9% (3/34) amplificaron el gen *cas1*, y se clasificaron en el sistema tipo I-E y el 15% (5/34) amplificaron el gen *cas3* y se clasificaron en el subtipo I-E* (Figura 6).

Figura 6

Amplificación de los genes cas1 y cas3 para la detección del sistema CRISPR



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados por PCR de punto final.

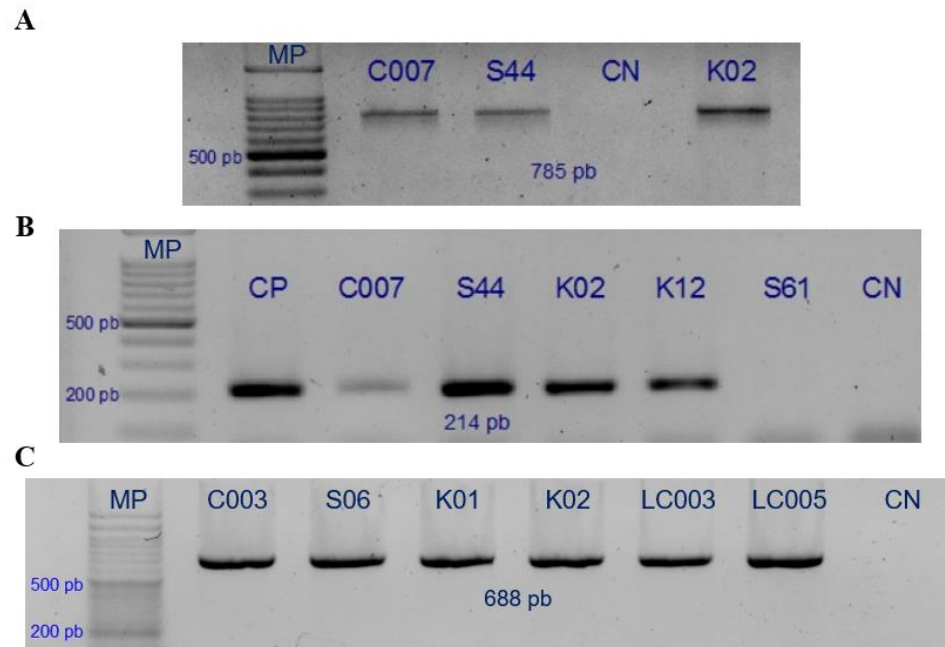
A) S112, LC053 y LC092 corresponden a los aislamientos positivos para el gen *cas1* (341 pb). B) S58, S65, LC072, K01 y K09 corresponden a los aislamientos positivos para el gen *cas3* (598 pb). CN corresponde al control negativo. MP corresponde al marcador de peso molecular ExcelBand™ 100 bp+3K DNA Ladder.

4.3. Distribución de genes de resistencia y virulencia

Se detectó el gen de la betalactamasa de espectro extendido SHV (*bla_{SHV}*) en el 97% (33/34) de los aislamientos. El gen de la carbapenemasa KPC (*bla_{KPC}*) se encontraba en el 9% (3/34) de los aislamientos, los cuales portaban el gen *bla_{SHV}* simultáneamente. En el caso de la adhesina fimbria tipo I (*fimH1*), se presentó en el 82.4% (28/34) del total de aislamientos, de los cuales todos fueron aislados de ITU (Figura 7).

Figura 7

Amplificación de los genes bla_{SHV} , bla_{KPC} y $fimHI$ en los aislamientos clínicos



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados por PCR de punto final. A) C007, S44 y K02 corresponden a los aislamientos positivos para el gen bla_{KPC} (785 pb). B) C007-K12 corresponden a los aislamientos positivos para el gen bla_{SHV} (214 pb), S61 fue el único aislamiento negativo para el mismo. CP corresponde al control positivo *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705. C) C003-LC005 corresponden a los aislamientos positivos para el gen $fimHI$ (688 pb). CN corresponde al control negativo. MP corresponde al marcador de peso molecular ExcelBand™ 100 bp+3K DNA Ladder.

Es importante destacar que dos de los 34 aislamientos (5.9%) mostraron simultáneamente los dos genes de resistencia, bla_{SHV} y bla_{KPC} , así como el factor de virulencia $fimHI$.

Tabla 3*Detección de los genes de resistencia y virulencia en los aislamientos clínicos*

Genes	N° aislamientos (n, %)
<i>bla_{SHV}</i>	33 (97%)
<i>bla_{KPC}</i>	3 (9%)
<i>fimH1</i>	28 (82.4%)
<i>bla_{SHV}, bla_{KPC}</i>	3 (9%)
<i>bla_{SHV}, fimH1</i>	27 (79.4%)
<i>bla_{KPC}, fimH1</i>	2 (5.9%)
<i>bla_{SHV}, bla_{KPC}, fimH1</i>	2 (5.9%)

La prevalencia de los genes asociados a la virulencia y farmacorresistencia fue menor en los aislados CRISPR/Cas positivos en comparación con los que no tenían CRISPR/Cas. No obstante, la distribución de *bla_{KPC}*, *bla_{SHV}* y *fimH1* entre estos dos grupos no fue estadísticamente significativa (Tabla 4).

Tabla 4*Distribución de genes entre CRISPR/Cas+ y CRISPR/Cas- con valores p*

Gen	CRISPR/Cas +(N=8)	CRISPR/Cas - (N=26)	Valor P	Odds Ratio
<i>bla_{SHV}</i>	8 (100%)	25 (96.2%)	1	Inf
<i>bla_{KPC}</i>	0	3 (11.5%)	1	0
<i>fimH1</i>	7 (87.5%)	21 (80.8%)	1	1.64

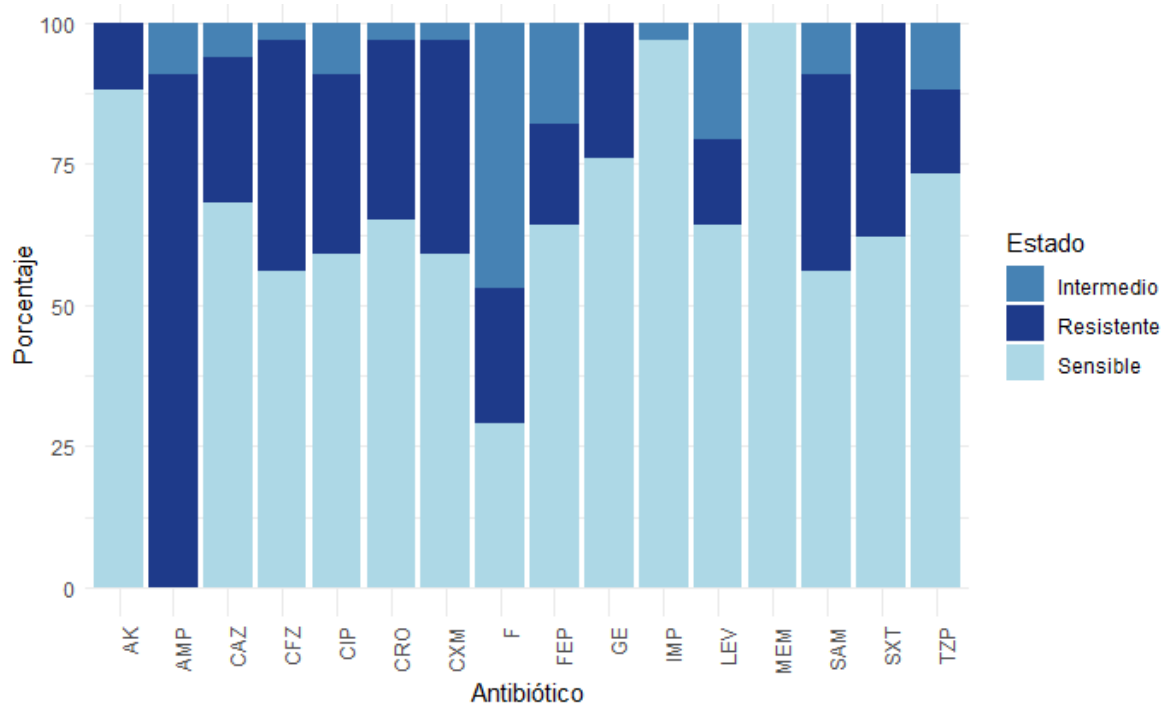
Nota. Se calculó el valor de P y OR (odds ratio) a través de la prueba exacta de Fisher ($P < 0.05$).

4.4. Perfiles de susceptibilidad/resistencia a los antibióticos en los aislamientos clínicos

Se realizó la determinación de la MIC en los 34 aislamientos para 16 antibióticos diferentes pertenecientes a los grupos betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, sulfonamidas y nitrofuranos (Figura 8).

Figura 8

Distribución de los perfiles de susceptibilidad/resistencia en los aislamientos clínicos



Nota. Porcentajes de resistencia determinados por MIC en los aislamientos clínicos. Los antibióticos evaluados fueron amikacina (AK), ampicilina (AMP), ceftazidima (CAZ), cefazolina (CFZ), ciprofloxacina (CIP), ceftriaxona (CRO), cefuroxima (CXM), nitrofurantoína (F), cefepima (FEP), gentamicina (GE), imipenem (IMP), levofloxacina (LEV), meropenem (MEM), ampicilina sulbactam (SAM), trimetoprima-sulfametoxazol (SXT), piperacilina tazobactam (TZP).

Aquí se evidencia un 100% de sensibilidad a meropenem (MEM), 97% a imipenem (IMP), 88% a amikacina (AK), 76% a gentamicina (GE), 74% a piperacilina tazobactam (TZP), 68% a ceftazidima (CAZ), 65% a cefepime (FEP), ceftriaxona (CRO) y levofloxacin (LEV); 62% a trimetoprima-sulfametoxazol (SXT), 59% a ciprofloxacina (CIP) y cefuroxima (CXM), 56% a cefazolina (CFZ) y ampicilina sulbactam (SAM), 29% a nitrofurantoína (F). Finalmente, ninguno de los aislamientos fue sensible a la ampicilina (AMP).

Por otra parte, el 91% de los aislamientos fue resistente a AMP, 41% a CFZ, 38% a CXM y SXT, 35% a SAM, 32% a CRO y CIP, 26% a CAZ, 24% a GE y F, 18% a FEP, 15% a TZP y LEV, 12% a AK. Ninguno de los aislamientos presentó resistencia a IMP o MEM.

Adicionalmente, se encontraron perfiles de multidrogoresistencia (MDR) en 12 de los 34 aislamientos (Tabla 5). Se presentó el mismo perfil de resistencia en tres (3) de los aislamientos MDR: CFZ, GE, AMP, CXM, FEP, CRO, TZP, SAM, AK, SXT, LEV, CIP, CAZ, F.

Tabla 5

Perfil de resistencia de los aislamientos clínicos clasificados como MDR

Aislamientos	Perfil MDR	Nº AB_R
C007, S06, K07	CFZ, GE, AMP, CXM, FEP, CRO, TZP, SAM, AK, SXT, LEV, CIP, CAZ, F	14
K01	CFZ, GE, AMP, CXM, FEP, CRO, SAM, SXT, LEV, CIP, CAZ	11
K02	CFZ, AMP, CXM, FEP, CRO, TZP, SAM, SXT, CAZ, F	10
S150	CFZ, GE, AMP, CXM, FEP, CRO, SAM, SXT, CIP, CAZ	10
S68	CFZ, AMP, CXM, CRO, SAM, SXT, CIP, CAZ, F	9
S19	CFZ, GE, AMP, CXM, FEP, SAM, SXT, CIP	8
S44	CFZ, AMP, CXM, CRO, SAM, SXT, CIP, CAZ	8
S08	CFZ, GE, AMP, CXM, CRO, SXT, CIP	7
K12	CFZ, AMP, SAM, SXT, CIP	5
LC092	AMP, LEV, CIP, F	4

Nota. Se muestran los aislamientos que presentaron resistencia a tres grupos de antibióticos diferentes. La clasificación MDR se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la *Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos de la Organización*

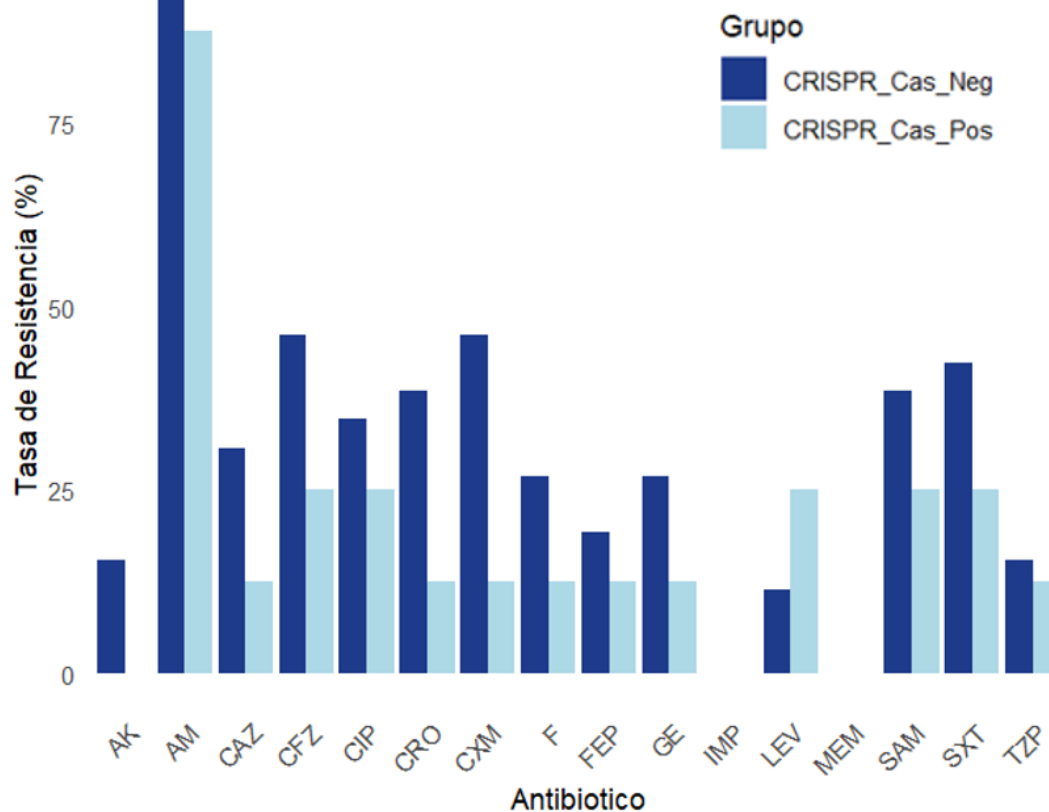
Panamericana de la Salud (OPS) (Pearson et al., 2019). N° AB_R corresponde al número de antibióticos a los cuales presentan resistencia los aislamientos listados en la tabla.

4.5. Asociación entre la resistencia a antibióticos y los sistemas CRISPR

El análisis de los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* reveló que aquellos aislamientos que poseen el sistema CRISPR muestran mayores porcentajes de sensibilidad a antibióticos como β -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos, sulfonamidas y nitrofuranos, comparados con aquellos aislamientos que carecen el sistema CRISPR (Figura 9).

Figura 9

Tasas de resistencia a antibióticos entre aislamientos CRISPR/Cas positivos y negativos de K. pneumoniae



Los resultados de la prueba exacta de Fisher indicaron una tendencia hacia una menor resistencia en las cepas CRISPR/Cas positivas con una odds ratio de 0.511 (Tabla 6).

Tabla 6

Tasas de resistencia a antibióticos entre aislamientos CRISPR/Cas positivos y negativos de K. pneumoniae

Antibiótico	Tasa de resistencia		Valor p	OR
	CRISPR/Cas + (N=8)	CRISPR/Cas - (N=26)		
CFZ	25.0 (2)	46.15 (12)	0.4220542	0.39
GE	12.5 (1)	26.92 (7)	0.6449456	0.39
AM	87.5 (7)	92.30 (24)	1.0000000	0.58
CXM	12.5 (1)	46.15 (12)	0.1163687	0.17
FEP	12.5 (1)	19.23 (5)	1.0000000	0.60
CRO	12.5 (1)	38.46 (10)	0.2274641	0.23
TZP	12.5 (1)	15.38 (4)	1.0000000	0.79
SAM	25.0 (2)	38.46 (10)	0.6809091	0.53
MEM	0.0	0.00	1.0000000	N/A
IMP	0.0	0.00	1.0000000	N/A
AK	0.0	15.38 (4)	0.5514922	0.00
SXT	25.0 (2)	42.30 (11)	0.4437665	0.45
LEV	25.0 (2)	11.53 (3)	0.5701800	2.56
CIP	25.0 (2)	34.61 (9)	1.0000000	0.63
CAZ	12.5 (1)	30.76 (8)	0.4030404	0.32
F	12.5 (1)	26.92 (7)	0.6449456	0.39

Nota. Se calculó el valor de P y OR (odds ratio) a través de la prueba exacta de Fisher ($P < 0.05$).

Adicionalmente, se evaluó la relación entre la presencia del sistema CRISPR/Cas y el perfil de resistencia en aislamientos de *K. pneumoniae*. En la tabla 7 se observa que, dentro del grupo de aislamientos que poseen el sistema CRISPR/Cas (N=8), el 25% (n=2) exhiben un perfil de resistencia multirresistente (MDR), mientras que el 75% (n=6) no presentan dicho perfil.

Tabla 7

Perfiles MDR entre los aislamientos CRISPR/Cas positivos y negativos de K. pneumoniae

Perfil resistencia	CRISPR/Cas +(N=8)	CRISPR/Cas - (N=26)	Valor P	Odds Ratio
MDR	2 (25%)	10 (38.5%)	0.681	0.53
No MDR	6 (75%)	16 (61.5%)	0.681	0.53

Nota. Se calculó el valor de P y OR (odds ratio) a través de la prueba exacta de Fisher ($P < 0.05$).

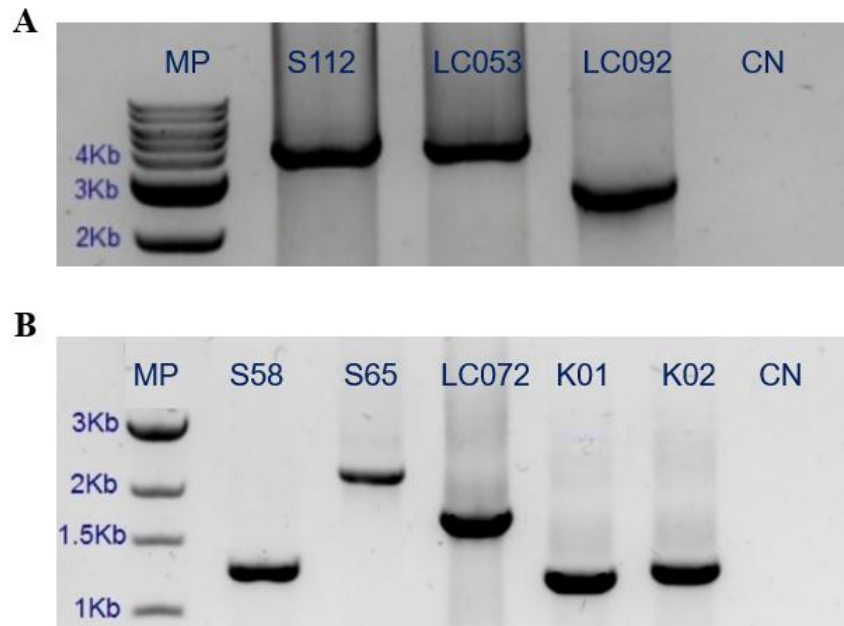
4.6. Caracterización de los arreglos CRISPR1 y CRISPR2 en los aislamientos clínicos que presentan el sistema CRISPR

A los ocho (8) aislamientos que presentaron el sistema CRISPR (ver sección 4.2) se les realizó la caracterización de los arreglos CRISPR1 a los aislamientos *cas1* positivos y CRISPR2, a los aislamientos *cas3* positivos, utilizando los iniciadores diseñados (sección 3.4).

En la figura 10 se observa que tres (3) aislamientos presentaban el arreglo CRISPR1 y cinco (5) el arreglo CRISPR2 y que el tamaño de amplicón presentó variación en el tamaño (pb) oscilando entre 2500 pb – 4000 pb para CRISPR1 y entre 1200 pb – 2000 pb para CRISPR2.

Figura 10

Amplificación de los arreglos CRISPR1 y CRISPR2 de los aislamientos con CRISPR



Nota. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados por PCR convencional. A) S112, LC053 y LC092 corresponden a los aislamientos que presentan el arreglo CRISPR1. B) S58-K09 corresponden a los aislamientos que presentan el arreglo CRISPR2. CN corresponde al control negativo. MP corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb.

Se realizó la secuenciación y análisis de los arreglos CRISPR a 6 de los 8 aislamientos, debido a la complejidad genómica de estas regiones no fue posible secuenciar 2 de los arreglos. Empleando la herramienta *CRISPRFinder* se encontró que estos arreglos estaban compuestos por repeticiones directas conservadas en *K. pneumoniae* de 29 pb: 5'-CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC-3' para CRISPR1 y 28 pb: 5'-GTCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTC-3' para CRISPR2 (Tabla 8).

Tabla 8

Composición de los arreglos CRISPR1 y CRISPR2 en los seis (6) aislamientos secuenciados

Aislado	Tipo	Arreglo	Tamaño (pb)	DR (5'-3')	Long (pb)
S58	I-E*	CRISPR2	1200	GTCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTC	28
S112	I-E	CRISPR1	4000	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC	29
LC072	I-E*	CRISPR2	1500	GTCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCC	29
LC092	I-E	CRISPR1	3000	CGGTTTATCCCCGCTGGCGCGGGGAACAC	29
K01	I-E*	CRISPR2	1200	GTCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTC	28
K09	I-E*	CRISPR2	1300	GTCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCT	29

Nota. Descripción de las DR identificadas en los dos (2) tipos de arreglos CRISPR secuenciados.

Se identificaron 29 espaciadores diferentes en los 6 aislamientos analizados, los cuales tenían una longitud de entre 29 y 35 pb. De estos, 20 espaciadores están reportados en genomas de *K. pneumoniae* que tienen el sistema CRISPR, es decir, se trata de espaciadores conservados en esta especie. Por otra parte, los nueve (9) espaciadores restantes se relacionaban con genomas de fagos de *Klebsiella* y plásmidos portadores de genes de resistencia reportados en *K. pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 9).

Además, se realizó un análisis con *BLASTn* a las secuencias obtenidas para relacionarlas con otras secuencias genómicas almacenadas en la base de datos con el fin de identificar la procedencia del aislado basados en las DR y los espaciadores. Los aislamientos recolectados en este estudio presentaron un alto porcentaje de identidad (100% - 99.3%) con aislamientos en otras partes del mundo como Noruega, Taiwán, China y Países Bajos (Apéndice B).

Tabla 9

Espaciadores encontrados en los arreglos CRISPR que coinciden con genomas, plásmidos o fagos

Aislamiento	Tipo CRISPR	Arreglo CRISPR	Espaciador (5'-3')	N° acceso GenBank	Origen
S58	I-E*	CRISPR2	TACACCCAGCTCTTTGACGCAAAGGCTCAGGAG	CP158197.1	Plásmido
			TCCTTGGTTCGTTTCTTCTGATGTTTGCAAGGC	CP097707.1	Plásmido
			CTGGTTGACGTATGCCGTGATGCTGCTGGTAGG	CP158197.1	Plásmido
			CGCTGTATGCCCCCATCCTTCGCAAGCACTAC	CP064232.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
S112	I-E	CRISPR1	AGTTAGTTCAGTTTCACCCAAGTGAACCC	CP157322.2	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			GTCTTCCCTGTTTGCTGCCTGCTGTCTGTCTG	CP103551.1	Plásmido
			GACGGAACGGCAGTGATATCCATGACGATCAC	CP157322.2	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			TGTCGGCACGGCGTAAGCCGGAACCTCAGACGA	CP176043.1	Plásmido
			GCAATAATTTTCTGCCACACACCTGACGCCGC	CP157322.2	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			TGCAACTCGATGCTCGAATGAACCTTTTGACCC	CP157322.2	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
LC072	I-E*	CRISPR2	CAAACCGAAGCGCTGTCACGCCTGAAAGAGC T	CP036438.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			CCAGAACCATGCCCCGTGGTGGACATTGGTGG	CP158197.1	Plásmido
			TAGCTTTTAAGGGGAATAAAAAGCCCCGGGC G	CP036438.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>

			TCGGGGCTTTGCTATTCTGCTATTTTGCTATTC	CP036438.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			CGCAACCACTGCCACCGATCGCATCGTAGCCGG	CP036438.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
LC092	I-E	CRISPR1	TCGCGGAGGAATAATCGTCAACGAATCGCA	CP153320.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			CCCCTCAAGGTTATAGCGCTGCTGGTTTCT	MF344568.1	Plásmido
			TACGTCGAAAACGAGCGTAAAACAGGTTTCATC	CP081894.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			TAGATGGATTCCTGGGTATCCCCCAAACAAA	CP081894.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			CTTTCTCGACGGACGATCCCGTTTACCTCGTTG	CP081894.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			TGACGCTATTTTTTGCCAGGACAACGGCTATGA	OR290970.1	Fago
K01	I-E*	CRISPR2	TTACGTGATCGATAGCGGGCTGTCATATAGCGA	CP081894.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			CTCGCCAGCGGCTGCACAAGTCTGACCAAATC C	CP081894.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			CCCAAACCCGCAGCGCGCACAAAAGCTCGTTTA	CP081894.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			CAGCTCGCTGTTTCGGGTTTGACTGACTGATCGC	CP067550.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			CAACAACACGGCATCCCGCGACCTGCTGAATTT	CP067550.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
			TACACCCAGCTCTTTGACGCAAAGGCTCAGGAG	CP158197.1	Plásmido
K09	I-E*	CRISPR2	TCCTTGGTTCGTTTCTTCTGATGTTTGCAAGGC	CP097707.1	Plásmido
			CTGGTTGACGTATGCCGTGATGCTGCTGGTAGG	CP158197.1	Plásmido

CGCTGTATGCCCCCATCCTTCGCAAGCACTAC	CP064232.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
GATGACAACCTTTGCCTACTTCGCTGCGCTGGC	OW848780.1	Plásmido
CTGTTAAGGATGACGCGGGGAAATGGGTTATC	CP064232.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>
CGATGGCGAGCTGCTGGTGAAAAAGTCGATAC	CP064205.1	Genoma <i>K. pneumoniae</i>

Nota. Descripción de los espaciadores encontrados en los aislamientos analizados. Cada espaciador se relaciona con el arreglo CRISPR al que pertenece y el código de acceso de *GenBank* del elemento genético móvil al cuál se asemeja.

5. Discusión

K. pneumoniae pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y se encuentra ampliamente distribuida en el sistema digestivo de humanos y animales (Abbas et al., 2024; Pruss et al., 2025; Sedrakyan et al., 2025; Tsang et al., 2024). Actualmente, el aumento en la prevalencia de aislamientos altamente virulentos y multirresistentes ha llevado a organismos como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) a clasificar esta bacteria como una de las principales amenazas para la salud pública a nivel global (OMS, 2021; OPS, 2021a). A pesar de este desafío, la presencia de los sistemas CRISPR/Cas en *K. pneumoniae* podría limitar la adquisición de plásmidos que contienen genes de virulencia y resistencia a los antibióticos, contribuyendo así a la regulación de la diseminación de estos determinantes genéticos dentro de la población bacteriana (Kadkhoda et al., 2025; X. Li et al., 2024; Montazeri et al., 2024). La prevalencia del sistema CRISPR/Cas en *K. pneumoniae* puede variar entre 12.4 – 30.7% (Hu et al., 2023; Li et al., 2018; Lin et al., 2016; Wang et al., 2020).

En este estudio se encontró que el 24% (8/34) de los aislamientos recolectados fueron positivos para el sistema CRISPR, estos resultados son consistentes con lo reportado por Li *et al.* (2018), quienes señalan una baja prevalencia de sistemas CRISPR en aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*, posiblemente debido a la ventaja evolutiva que representa la ausencia de estos sistemas para facilitar la adquisición de elementos genéticos móviles, como los plásmidos que portan genes de resistencia (Kamruzzaman & Iredell, 2020; Tang et al., 2020; Zhou et al., 2020).

Adicionalmente, de los aislamientos CRISPR positivos, 15% fueron clasificados en el sistema subtipo I-E*, y el 9% en el tipo I-E, los cuales son característicos de *K. pneumoniae* y otras enterobacterias (Xue & Sashital, 2019). Esto se ha documentado en estudios previos donde estos tipos de sistemas CRISPR predominan en miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, como

Escherichia coli y *Salmonella spp.*, debido a una distribución evolutiva conservada en este grupo bacteriano (Makarova et al., 2015; Medina et al., 2018; Xue & Sashital, 2019).

Los hallazgos del análisis BLASTn realizado sobre los arreglos CRISPR de los aislamientos de *K. pneumoniae* sugieren que las cepas bacterianas pueden estar sujetas a procesos de dispersión a nivel global, posiblemente facilitados por factores asociados a la globalización, como el comercio internacional, el turismo y la migración humana (Pedro et al., 2025), lo cual explicaría la identificación de secuencias genómicas relacionadas con aislamientos originarios de Noruega, Taiwán, China y los Países Bajos. En este contexto, proponemos a los sistemas CRISPR como una herramienta prometedora para rastrear patrones de migración de cepas bacterianas, ya que sus espaciadores actúan como una memoria genética de exposiciones previas a fagos y plásmidos, proporcionando así una firma molecular única que puede vincular aislamientos de diferentes regiones geográficas.

El análisis de la composición y diversidad de los espaciadores realizado en los aislamientos clínicos permitió evaluar la relación de los sistemas CRISPR con la dinámica de la transferencia horizontal de genes de resistencia. La identificación de espaciadores asociados con plásmidos y fagos que se observa en la tabla 9 es consistente con la literatura, donde se describe a los sistemas CRISPR como herramientas clave para limitar la adquisición de material genético exógeno (Kadkhoda et al., 2025; Wang et al., 2020; Xue & Sashital, 2019; Zhou et al., 2020). Asimismo, estudios como el de Tang et al. (2020) han resaltado la importancia de estos arreglos en la epidemiología molecular, destacando su uso potencial para rastrear clonalidades y relaciones filogenéticas entre aislamientos clínicos (Tang et al., 2020). Los resultados obtenidos a través de esta metodología no solo permiten determinar la presencia y diversidad de los sistemas CRISPR,

sino también inferir su impacto e implicaciones en el control de la resistencia antimicrobiana y la vigilancia epidemiológica de *K. pneumoniae*,

La alta prevalencia del gen *bla_{SHV}* (97%) en los aislamientos estudiados subraya su rol como principal determinante de resistencia en *K. pneumoniae* (Tsang et al., 2024), mientras que el gen *bla_{KPC}*, presente en el 9% de los aislamientos, representa un riesgo significativo debido a su capacidad para generar resistencia a los carbapenémicos y su asociación con la multidrogoresistencia (Ehsan et al., 2023; Ghasemnejad et al., 2019; Hu et al., 2023; Karampatakis et al., 2023). Es importante destacar que los aislamientos que contenían genes *bla_{KPC}* también eran *bla_{SHV}* positivos, lo que sugiere una posible coocurrencia de genes de resistencia que podría amplificar la resistencia a múltiples clases de antibióticos (S. Kumar et al., 2023). La distribución de estos genes fue menor en los aislamientos CRISPR positivos en comparación con las CRISPR negativos, apoyando la hipótesis de que los sistemas CRISPR limitan la adquisición de elementos genéticos móviles (Kadkhoda et al., 2024; X. Li et al., 2024; Montazeri et al., 2024). No obstante, la ausencia de significancia estadística en esta asociación destaca la necesidad de ampliar el tamaño de la muestra en futuras investigaciones para confirmar estas observaciones como se evidencia en otros estudios (Kadkhoda et al., 2024; Liao et al., 2020; Wang et al., 2020).

En cuanto a los factores de virulencia, la alta prevalencia del gen *fimH1* (82.4%) se relaciona con el origen de infecciones del tracto urinario de la mayoría de estos aislamientos, resultado que destaca la importancia de esta adhesina en la colonización de las células del hospedero, como se ha reportado previamente (Govindarajan & Kandaswamy, 2022; Nazari et al., 2024). Además, el aislamiento LC122 proveniente de una úlcera en piel no presentó este factor, lo que podría reflejar diferencias en los mecanismos de patogenicidad según el sitio de infección (Bai & Guo, 2024; Chang et al., 2021). Es relevante destacar que los aislamientos CRISPR positivos

presentaron una menor prevalencia de este factor de virulencia, lo que podría estar relacionado con una menor capacidad para adquirir genes asociados a virulencia mediante transferencia horizontal. A pesar de lo observado en este estudio, la anterior afirmación difiere con lo propuesto por estudios previos, donde se observa que aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* CRISPR positivos tienden a poseer una mayor presencia de factores de virulencia en relación con los CRISPR negativos (X. Li et al., 2024; Liao et al., 2020).

Se observó una alta resistencia a cefalosporinas de primera y segunda generación, como CFZ (41%) y CXM (38%), así como a fluoroquinolonas, especialmente CIP (32%). Estos patrones de resistencia reflejan el impacto del uso extensivo de estas clases de antibióticos en el ámbito clínico y destacan la necesidad de estrategias que promuevan un uso racional de los antimicrobianos (OMS, 2021; OPS, 2021a; Rodríguez et al., 2023). Los resultados del MIC muestran una alta eficacia de los carbapenémicos (meropenem e imipenem) frente a los aislamientos de *K. pneumoniae*, con tasas de sensibilidad del 100% y 97%, respectivamente. Este hallazgo es alentador en el contexto local, pues reflejan la alta eficacia de los carbapenémicos contra *K. pneumoniae*, siendo estos antibióticos de última línea para el tratamiento de infecciones graves por patógenos resistentes (Kadkhoda et al., 2025; Lin et al., 2024; Zhanel et al., 2012). Estos resultados subrayan el potencial de los carbapenémicos como tratamiento clave contra *K. pneumoniae* en este contexto y abren la posibilidad de explorar más a fondo el papel del sistema CRISPR/Cas en la modulación de la resistencia antibiótica (Kadkhoda et al., 2025; Liao et al., 2020; Lin et al., 2016).

En general, los resultados obtenidos muestran una tendencia hacia una menor resistencia en cepas CRISPR/Cas positivas, la cual se ha observado en los últimos años (Dziuba et al., 2023; Kadkhoda et al., 2024; Kamruzzaman & Iredell, 2020; X. Li et al., 2024; Montazeri et al., 2024;

Wang et al., 2020). Los aislamientos CRISPR positivos mostraron una menor resistencia a varias clases de antibióticos en comparación con los CRISPR negativos, incluidas cefalosporinas, fluoroquinolonas y sulfonamidas. Un ejemplo de esto es que la resistencia a CXM fue del 25% en aislamientos CRISPR positivos frente al 46.15% en CRISPR negativos, y la resistencia a CIP fue del 25% frente al 34.61%, respectivamente. Aunque estos datos sugieren una probabilidad menor de resistencia en las cepas CRISPR positivas, el valor p obtenido no alcanzó la significancia estadística ($p > 0.05$), lo que impide confirmar esta asociación de manera concluyente.

Estas observaciones podrían explicarse por la capacidad de los sistemas CRISPR para limitar la transferencia horizontal de genes de resistencia como es el caso de la adquisición de plásmidos que contienen genes de resistencia (Kamruzzaman & Iredell, 2020; Shelenkov et al., 2025; Tang et al., 2020; Zhou et al., 2020). La menor carga genética de resistencia podría también estar vinculada a un menor costo metabólico en estos aislamientos, lo que podría influir en su supervivencia y capacidad de infección en diferentes entornos (Lin et al., 2016; Wang et al., 2022). En este contexto, futuras investigaciones podrían explorar cómo las condiciones hospitalarias afectan la expresión y funcionalidad de los sistemas CRISPR. Estos hallazgos justifican estudios adicionales con tamaños muestrales más grandes y análisis más detallados para explorar el rol potencial del sistema CRISPR/Cas en la modulación de la resistencia antibiótica.

No obstante, al analizar la relación entre la presencia del sistema CRISPR/Cas y la multidrogorresistencia en *K. pneumoniae* se observa que esta no sigue estrictamente un patrón inverso, como se ha reportado en estudios previos (Basnet et al., 2024; Jhalora et al., 2024; Ma et al., 2024; Sedrakyan et al., 2025). Aunque se observó una menor proporción de aislamientos MDR en el grupo CRISPR/Cas positivo en comparación con el negativo (25% vs. 38.5%), esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.681$, $OR=0.53$). Esto plantea la posibilidad de que, en

K. pneumoniae, la presencia del sistema CRISPR/Cas no siempre implique una función activa en la exclusión de elementos genéticos móviles relacionados con la resistencia. En este sentido, surge la inquietud de si podría existir un mecanismo de silenciamiento del sistema CRISPR en algunos aislamientos, permitiendo así la adquisición y mantenimiento de genes de resistencia, aun en presencia de los arreglos CRISPR.

Para abordar esta cuestión, futuros estudios podrían enfocarse en evaluar la expresión de los componentes del sistema CRISPR/Cas mediante análisis de ARN mensajero (qRT-PCR o RNA-Seq) en aislamientos con y sin perfil MDR (Kretz et al., 2024; Roberts et al., 2024). Otro enfoque complementario sería la caracterización funcional de los espaciadores CRISPR mediante ensayos de interferencia con plásmidos marcadores, lo que permitiría determinar si los arreglos CRISPR identificados tienen capacidad para reconocer y degradar elementos genéticos asociados a la resistencia (Cao et al., 2016; Zhou et al., 2020). La integración de estas metodologías contribuiría a esclarecer si el sistema CRISPR en *K. pneumoniae* está activo o si existen factores que limitan su función en la dinámica de la resistencia antimicrobiana.

Finalmente, la identificación de arreglos CRISPR en *K. pneumoniae* tiene un valor significativo en la tipificación molecular de aislamientos clínicos resistentes a antibióticos. Los sistemas CRISPR, particularmente los subtipos I-E e I-E* identificados en este estudio, permiten discriminar entre cepas con diferentes perfiles genéticos y fenotípicos de resistencia, proporcionando una herramienta complementaria a las técnicas convencionales de tipificación molecular. Al restringir la adquisición de elementos genéticos móviles como plásmidos de resistencia (Kadkhoda et al., 2025; Kadkhoda et al., 2024; Kamruzzaman & Iredell, 2020; Makarova et al., 2015), los aislamientos CRISPR positivos presentan una dinámica genómica distinta, lo que puede ser utilizado para establecer patrones epidemiológicos y rastrear la

diseminación de clones resistentes en el entorno hospitalario. De esta manera, los arreglos CRISPR enriquecen el entendimiento de la diversidad genética de *K. pneumoniae*, y también pueden contribuir al diseño de estrategias de control dirigidas a mitigar la resistencia antimicrobiana en el ámbito clínico.

6. Conclusiones

El análisis de los arreglos CRISPR en *K. pneumoniae* resistentes a antibióticos en Bucaramanga reveló una notable variabilidad genética, evidenciada tanto en la presencia diferencial de estos sistemas como en la composición y diversidad de sus espaciadores. La mayoría de aislamientos caracterizados carecen de sistemas CRISPR, lo que sugiere que la presencia de CRISPR dentro de la población de *K. pneumoniae* está sujeta a diferentes fuerzas evolutivas como, por ejemplo, la presión selectiva para adquirir elementos genéticos móviles. Este estudio destaca la utilidad de los sistemas CRISPR en la tipificación molecular de esta bacteria, gracias a su heterogénea distribución y polimorfismo de longitud, lo que aumenta la información sobre las bacterias que se encuentran en ambientes hospitalarios.

A su vez, este análisis permitió identificar una posible relación inversa entre CRISPR y la presencia del gen *bla_{KPC}*, sugiriendo que los sistemas CRISPR podrían desempeñar un papel en la limitación de la adquisición de genes de resistencia. Este hallazgo refuerza la hipótesis de que los sistemas CRISPR pueden desempeñar un papel en la limitación de la diseminación de genes de resistencia, sugiriendo un posible impacto en la epidemiología molecular de *K. pneumoniae*.

También se evidenció una alta prevalencia de genes de resistencia como *bla_{KPC}* y *bla_{SHV}*, lo que refuerza la necesidad de fortalecer los programas de vigilancia epidemiológica y optimizar el uso de antibióticos en entornos hospitalarios. La comprensión de la dinámica entre los sistemas CRISPR y los determinantes genéticos de resistencia podría contribuir al diseño de estrategias innovadoras para el control de la diseminación de genes de resistencia, con implicaciones clínicas y epidemiológicas significativas.

Estos resultados subrayan el valor de los sistemas CRISPR no solo como posibles marcadores para la tipificación de *K. pneumoniae*, sino también como elementos clave en la

regulación de la transferencia de genes de resistencia, lo que podría abrir nuevas perspectivas en el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la manipulación de estos sistemas.

7. Recomendaciones

Realizar la secuenciación completa de los arreglos CRISPR permitiría caracterizar con mayor precisión la composición y organización de estos sistemas en *K. pneumoniae*. Al proporcionar información detallada sobre la estructura completa de los locus CRISPR se facilitaría la identificación de espaciadores y su relación con elementos genéticos móviles como fagos y plásmidos, además de darnos información sobre el patrón de migración de las cepas, lo cual podría contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la manipulación de estos sistemas

Explorar la interacción CRISPR-resistencia antimicrobiana en diferentes entornos utilizando aislamientos provenientes de diversas regiones y contextos (comunitarios y hospitalarios) para validar los resultados obtenidos y ampliar la comprensión sobre la relación inversa entre los sistemas CRISPR y genes de resistencia como *bla_{KPC}*.

Complementar el análisis genético con la evaluación de otros factores de virulencia y genes de resistencia asociados a infecciones severas/multirresistentes, para establecer una visión más integral de la dinámica genómica de esta bacteria.

Dado el alto impacto clínico de genes como *bla_{KPC}* y *bla_{SHV}*, se debe priorizar su identificación y seguimiento en aislamientos clínicos, especialmente en entornos hospitalarios con alta incidencia de infecciones por bacterias resistentes.

Se invita a fomentar el trabajo conjunto entre investigadores, clínicos, epidemiólogos y formuladores de políticas públicas, para garantizar un enfoque integral y efectivo en el manejo de la resistencia antimicrobiana.

Referencias Bibliográficas

- Abbas, R., Chakkour, M., Dine, H. Z. E., Obaseki, E. F., Obeid, S. T., Jezzini, A.,...Ezzeddine, Z. (2024). General Overview of Klebsiella pneumonia: Epidemiology and the Role of Siderophores in Its Pathogenicity. *Biology* 2024, Vol. 13, Page 78, 13(2). <https://doi.org/10.3390/biology13020078>
- Abduljabbar, A., Aljanaby, J., Hassan, A., & Alhasani, A. (2016). Virulence factors and antibiotic susceptibility patterns of multidrug resistance Klebsiella pneumoniae isolated from different clinical infections. *African Journal of Microbiology Research*, 10(22), 829-843. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8051>
- Ahmed, S. K., Hussein, S., Qurbani, K., Ibrahim, R. H., Fareeq, A., Mahmood, K. A., & Mohamed, M. G. (2024). Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health*, 2. <https://doi.org/10.1016/j.gmedi.2024.100081>
- Ayobami, O., Brinkwirth, S., Eckmanns, T., & Markwart, R. (2022). Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 443-451. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2030196>
- Bai, R., & Guo, J. (2024). Interactions and Implications of Klebsiella pneumoniae with Human Immune Responses and Metabolic Pathways: A Comprehensive Review. *Infection and Drug Resistance*, Volume 17. <https://doi.org/10.2147/IDR.S451013>
- Barman, A., Deb, B., Chakraborty, S., Barman, A., Deb, B., & Chakraborty, S. (2019). A glance at genome editing with CRISPR–Cas9 technology. *Current Genetics* 2019 66:3, 66(3). <https://doi.org/10.1007/s00294-019-01040-3>
- Basnet, A., Shrestha, M. R., Tamang, B., Pokhrel, N., Maharjan, R., Rai, J. R.,...Rai, S. K. (2024). Assessment of Antibiotic Resistance among Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Nepal. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 110(2), 283-290. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.23-0199>
- Bengoechea, J. A., Pessoa, J. S., & Whitfield, C. (2019). Klebsiella pneumoniae infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(2), 123-144. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUY043>
- Bina, M., Pournajaf, A., Mirkalantari, S., Talebi, M., & Irajian, G. (2015). Detection of the Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) in K. pneumoniae Isolated from the Clinical Samples by the Phenotypic and Genotypic Methods. *Iranian Journal of Pathology*, 10(3), 199-199.
- Bravata, J. C., Bello-Lopez, J. M., Cortes-Ortiz, I. A., Mendez-Velazquez, J. J., Aviles-Soto, B., Quintas-Granados, L. I.,...Martinez, M. S. (2019). Distribution of virulence and antimicrobial resistance genes in phylogenetic groups of Escherichia coli strains isolated from Mexican patients with urinary infection. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 12(3).
- Cadena, E. D. I., Mojica, M. F., Rojas, L. J., Castro, B. E., García-Betancur, J. C., Marshall, S. H.,...Villegas, M. V. (2024). First report of KPC variants conferring ceftazidime-avibactam resistance in Colombia: introducing KPC-197. *Microbiology Spectrum*, 12(6). <https://doi.org/10.1128/spectrum.04105-23>
- Cao, L., Gao, C.-H., Zhu, J., Zhao, L., Wu, Q., Li, M., & Sun, B. (2016). Identification and functional study of type III-A CRISPR-Cas systems in clinical isolates of Staphylococcus

- aureus. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(8). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.08.005>
- CDC. (2019). *Antibiotic Resistance Threats in the United States*. <https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/media/pdfs/2019-ar-threats-report-508.pdf>
- Chang, D., Sharma, L., Dela Cruz, C. S., & Zhang, D. (2021). Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of Klebsiella pneumoniae Infection. *Frontiers in Microbiology*, 12, 750662-750662. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.750662/BIBTEX>
- CLSI. (2023). Clinical and Laboratory Standards Institute - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. In *CLSI Supplement M100*.
- Cubero González, M. (2016). Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de Klebsiella pneumoniae. *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*.
- Cui, Y., & Qu, X. (2024). CRISPR-Cas systems of lactic acid bacteria and applications in food science. *Biotechnology Advances*, 71. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108323>
- Doudna, J. (2022). *CRISPR en la naturaleza*. Innovative Genomics Institute, Universidad de California, Berkeley. <https://innovativegenomics.org/es/crisprpedia/crispr-en-la-naturaleza/>
- Dziuba, A., Dzierżak, S., Sodo, A., Wawszczak-Kasza, M., Zegadło, K., Białek, J.,...Adamus-Białek, W. (2023). Comparative study of virulence potential, phylogenetic origin, CRISPR-Cas regions and drug resistance of Escherichia coli isolates from urine and other clinical materials. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1289683-1289683. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1289683/FULL>
- Díez, C., Almendros, C., García, J., & Mojica, F. J. M. (2010). Diversity of CRISPR loci in Escherichia coli. *Microbiology (Reading, England)*, 156(5), 1351-1361. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036046-0>
- Ehsan, B., Haque, A., Qasim, M., Ali, A., & Sarwar, Y. (2023). High prevalence of extensively drug resistant and extended spectrum beta lactamases (ESBLs) producing uropathogenic Escherichia coli isolated from Faisalabad, Pakistan. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(5), 1-13. <https://doi.org/10.1007/S11274-023-03565-9/TABLES/4>
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., & Green, P. (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, 8(3). <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>
- Falco, A., Barrios, Y., Torres, L., Sandra, L., & Takiff, H. (2017). Epidemiología molecular de aislados clínicos de Klebsiella pneumoniae productores de carbapenemasas tipo KPC provenientes de dos hospitales públicos en los estados Carabobo y Zulia, Venezuela. *Invest. clín*, 3-21.
- Forero-Hurtado, D., Corredor-Rozo, Z. L., Ruiz-Castellanos, J. S., Márquez-Ortiz, R. A., Abril, D., Vanegas, N.,...Escobar-Pérez, J. (2023). Worldwide Dissemination of blaKPC Gene by Novel Mobilization Platforms in Pseudomonas aeruginosa: A Systematic Review. *Antibiotics 2023, Vol. 12, Page 658*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040658>
- Ghasemnejad, A., Doudi, M., & Amirmozafari, N. (2019). The role of the blaKPC gene in antimicrobial resistance of Klebsiella pneumoniae. *Iranian Journal of Microbiology*, 11(4), 288-288. <https://doi.org/10.18502/ijm.v11i4.1465>

- Govindarajan, D. K., & Kandaswamy, K. (2022). Virulence factors of uropathogens and their role in host pathogen interactions. *The Cell Surface*, 8, 100075-100075. <https://doi.org/10.1016/J.TCSW.2022.100075>
- Han, X., Zhou, J., Yu, L., Shao, L., Cai, S., Hu, H.,...Yu, Y. (2024). Genome sequencing unveils blaKPC-2-harboring plasmids as drivers of enhanced resistance and virulence in nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. *mSystems*, 9(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.00924-23>
- Heng, H., Yang, X., Ye, L., Tang, Y., Guo, Z., Li, J.,...Chen, S. (2024). Global genomic profiling of *Klebsiella pneumoniae*: A spatio-temporal population structure analysis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 63(2). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.107055>
- Hu, Y., Jiang, J., Wang, D., Guo, Q., & Wang, M. (2023). Coexistence of blaKPC-IncFII plasmids and type I-E* CRISPR-Cas systems in ST15 *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1125531>
- Huang, W., Wang, G., Sebra, R., Zhuge, J., Yin, C., Agüero, M.,...Fallon, J. (2017). Emergence and evolution of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* with both blaKPC and blaCTX-M integrated in the chromosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(7). https://doi.org/10.1128/AAC.00076-17/SUPPL_FILE/ZAC007176293S1.PDF
- Huang, Y., Li, J., Gu, D., Fang, Y., Chan, E. W., Chen, S., & Zhang, R. (2015). Rapid detection of K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* by MALDI-TOF MS. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 166495-166495. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2015.01435/BIBTEX>
- INS. (2022). Protocolo Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en el ámbito hospitalario. 5-9. <https://doi.org/10.33610/infoeventos.70>
- Jhalora, V., Bist, R., Jhalora, V., & Bist, R. (2024). A Comprehensive Review of Molecular Mechanisms Leading to the Emergence of Multidrug Resistance in Bacteria. *Indian Journal of Microbiology* 2024. <https://doi.org/10.1007/s12088-024-01384-6>
- Kadkhoda, H., Gholizadeh, P., Ghotaslou, R., Nabizadeh, E., Pirzadeh, T., Rezaee, M. A.,...Aghazadeh, M. (2025). Role of CRISPR-cas system on virulence traits and carbapenem resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Microbial Pathogenesis*, 199. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107151>
- 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* 2024 24:1, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09451-5>
- Kamruzzaman, M., & Iredell, J. R. (2020). CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2934-2934. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02934/BIBTEX>
- Karampatakis, T., Tsergouli, K., & Behzadi, P. (2023). Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options. *Antibiotics* 2023, Vol. 12, Page 234, 12(2), 234-234. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12020234>
- Kashefieh, M., Zeighami, H., Samadi Kafil, H., Gholizadeh, P., Sadeghi, J., Soroush Barhaghi, M. H.,...Ghotaslou, R. (2024). Molecular typing of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Molecular Biology Reports* 2024 51:1, 51(1). <https://doi.org/10.1007/s11033-024-09278-y>

- Khoshbakht, R., Kabiri, M., Neshani, A., Khaksari, M. N., Sadrzadeh, S. M., Mousavi, S. M.,...Ghavidel, M. (2022). Assessment of antibiotic resistance changes during the Covid-19 pandemic in northeast of Iran during 2020–2022: an epidemiological study. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 11(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/S13756-022-01159-Y/TABLES/7>
- Koonin, E. V., Makarova, K. S., & Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology*(37), 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>
- Kretz, J., Börner, J., Friedrich, T., McIntosh, M., Procida-Kowalski, T., Gerken, F.,...Klug, G. (2024). Frontiers | Function of the RNA-targeting class 2 type VI CRISPR Cas system of *Rhodobacter capsulatus*. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1384543>
- Kumar, G., Kumar, Y., Kumar, G., & Tahlan, A. K. (2023). Characterization of uropathogenic *E. coli* from various geographical locations in India. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 18(6), 1527-1535. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtumed.2023.07.003>
- Kumar, S., Anwer, R., & Azzi, A. (2023). Molecular typing methods & resistance mechanisms of MDR *Klebsiella pneumoniae*. *AIMS Microbiology*, 9(1), 112-112. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2023008>
- Kushwaha, S. K., Kumar, A. A., Gupta, H., & Marathe, S. A. (2023). The Phylogenetic Study of the CRISPR-Cas System in Enterobacteriaceae. *Current Microbiology*, 80(6), 1-15. <https://doi.org/10.1007/S00284-023-03298-W/FIGURES/4>
- Li, C., Chen, R., Qiao, J., Ge, H., Fang, L., Liu, R.,...Gou, J. (2024). Distribution and molecular characterization of carbapenemase-producing gram-negative bacteria in Henan, China. *Scientific Reports* 2024 14:1, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-65106-0>
- Li, H. Y., Kao, C. Y., Lin, W. H., Zheng, P. X., Yan, J. J., Wang, M. 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(JUL), 1595-1595. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01595/BIBTEX>
- Li, X., Wang, L., Lin, J., Gu, Y., Liu, Z., & Hu, J. (2024). Detection of CRISPR–Cas and type I R–M systems in *Klebsiella pneumoniae* of human and animal origins and their relationship to antibiotic resistance and virulence. *Microbiology Spectrum*. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00009-24>
- Li, Y., Xie, C., Zhang, Z., Liu, J., Chang, H., Liu, Y., & Qin, X. (2024). Molecular epidemiology and antimicrobial resistance profiles of *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in different regions of China. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1380678>
- Liao, W., Liu, Y., Chen, C., Li, J., Du, F., Long, D., & Zhang, W. (2020). Distribution of CRISPR-Cas Systems in Clinical Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains in a Chinese Tertiary Hospital and Its Potential Relationship with Virulence. *Microbial Drug Resistance*, 26(6). <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0276>
- Lin, T. L., Pan, Y. J., Hsieh, P. F., Hsu, C. R., Wu, M. C., & Wang, J. T. (2016). Imipenem represses CRISPR-Cas interference of DNA acquisition through H-NS stimulation in *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep31644>
- Lin, X.-c., Li, C.-l., Zhang, S.-y., Yang, X.-f., & Jiang, M. (2024). The Global and Regional Prevalence of Hospital-Acquired Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection:

- A Systematic Review and Meta-analysis. *Open Forum Infectious Diseases*, 11(2). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad649>
- Ma, J., Gao, K., Li, M., Zhou, J., Song, X., Zhang, Y.,...Li, L. (2024). Epidemiological and molecular characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from pediatric patients in Henan, China. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2024 23:1, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00757-5>
- Mackow, N. A., Shen, J., Adnan, M., KhanId, A. S., Fries, B. C., & Diago-NavarroId, E. (2019). CRISPR-Cas influences the acquisition of antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS ONE*, 14(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225131>
- Makarova, K. S., Haft, D. H., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Horvath, P.,...Koonin, E. V. (2011). Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature reviews. Microbiology*, 9(6), 467-477. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2577>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J.,...Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology* 2015 13:11, 13(11), 722-736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
- Medina, L., Avila, S. D., Rebollar, J. E., Calva, E., & Hernández, I. (2018). The CRISPR-Cas system in Enterobacteriaceae. *Pathogens and Disease*, 76, 2-15. <https://doi.org/10.1093/femspd/fty002>
- Mestrovic, T., Robles Aguilar, G., Swetschinski, L. R., Ikuta, K. S., Gray, A. P., Davis Weaver, N.,...Naghavi, M. (2022). The burden of bacterial antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: a cross-country systematic analysis. *The Lancet Public Health*, 7(11), e897-e913. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(22\)00225-0](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(22)00225-0)
- Montazeri, E. A., Saki, M., Savari, M., Meghdadi, H., Akrami, S., Montazeri, E. A.,...Akrami, S. (2024). Association between the presence of CRISPR-Cas system genes and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients admitted in Ahvaz teaching hospitals. *BMC Infectious Diseases* 2024 24:1, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-024-10018-7>
- Muzyukina, P., & Soutourina, O. (2024). CRISPR genotyping methods: Tracing the evolution from spoligotyping to machine learning. *Biochimie*, 217, 66-73. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2023.07.017>
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252-275. <https://doi.org/10.1093/FEMSRE/FUX013>
- Nazari, M., Hemmati, J., & Asghari, B. (2024). Comprehensive Analysis of Virulence Genes, Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Sequence Types in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2024(1). <https://doi.org/10.1155/cjid/1403019>
- Newire, E., Aydin, A., Juma, S., Enne, V. I., & Roberts, A. P. (2020). Identification of a Type IV-A CRISPR-Cas System Located Exclusively on IncHI1B/IncFIB Plasmids in Enterobacteriaceae. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01937>
- OMS. (2021). Resistencia a los antimicrobianos. In.
- OPS. (2021a). Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS - OPS. In.

- OPS. (2021b). *Países de las Américas avanzan en la fiscalización de la regulación sobre dispensación de antimicrobianos*. <https://www.paho.org/es/noticias/26-10-2021-paises-americanas-avanzan-fiscalizacion-regulacion-sobre-dispensacion>
- Osman, E. A., El-Amin, N., Adrees, E. A. E., Al-Hassan, L., & Mukhtar, M. (2020). Comparing conventional, biochemical and genotypic methods for accurate identification of *Klebsiella pneumoniae* in Sudan. *Access Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000096>
- Paczosa, M. K., & Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629-661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15/ASSET/BC53380B-7897-453E-8D3A-11A15859C177/ASSETS/GRAPHIC/ZMR0031624270006.JPEG>
- Pearson, M. A. J., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Valderrama, C. D., Marcano, N. S.,...Melano, R. G. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 43. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.65>
- Pedro, D. M., Santos, D., Meneses, M., Gonçalves, F., Domingos, G. J., Caneiras, C.,...Caneiras, C. (2025). Risk of Colonization with Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria Among Travellers and Migrants: A Narrative Review. *Tropical Medicine and Infectious Disease* 2025, Vol. 10, Page 26, 10(1). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed10010026>
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119-123. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2010.12.002>
- Pruss, A., Miładowska, K., Masiuk, H., Kwiatkowski, P., Jursa-Kulesza, J., Wojciuk, B.,...Dołęgowska, B. (2025). Epidemiological Analysis of a *K. pneumoniae* NDM Outbreak in a Temporary Ward for Patients with Primary COVID-19 Infection. *Microbiology Research* 2025, Vol. 16, Page 17, 16(1). <https://doi.org/10.3390/microbiolres16010017>
- Rada, A. M., Hernández-Gómez, C., Restrepo, E., & Villegas, M. V. (2019). Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*, 39(Sp. 1). <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>
- Roberts, A., Spang, D., Sanozky-Dawes, R., Nethery, M. A., & Barrangou, R. (2024). Characterization of *Ligilactobacillus salivarius* CRISPR-Cas systems. *mSphere*, 9(7). <https://doi.org/10.1128/msphere.00171-24>
- Rodríguez, M., Vásquez, G. A., & Cediél-Becerra, N. (2023). Alianzas públicas, privadas y público-privadas para implementar Una Salud como acción contra la resistencia antimicrobiana en Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 47, e64-e64. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.64>
- Saavedra, S. Y., Bernal, J. F., Montilla-Escudero, E., Arévalo, S. A., Prada, D. A., Valencia, M. F.,...Vegvari, C. (2021). Complexity of Genomic Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Colombia Urges the Reinforcement of Whole Genome Sequencing-Based Surveillance Programs. *Clinical infectious diseases*, 73(Suppl_4), S290-S299. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAB777>
- Salmanov, A., Shcheglov, D., Svyrydiuk, O., Bortnik, I., Mamonova, M., Korniyenko, S.,...Bondar, T. (2023). Epidemiology of healthcare-associated infections and mechanisms of antimicrobial resistance of responsible pathogens in Ukraine: a multicentre study. *Journal of Hospital Infection*, 131, 129-138. <https://doi.org/10.1016/J.JHIN.2022.10.007>

- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed research international*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
- Sedrakyan, A., Gevorgyan, Z., Zakharyan, M., Arakelova, K., Hakobyan, S., Hovhannisyan, A.,...Aminov, R. (2025). Molecular Epidemiology and In-Depth Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates from Armenia. *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol. 26, Page 504, 26(2). <https://doi.org/10.3390/ijms26020504>
- Shankar, C., Vasudevan, K., John Jacob, J., Baker, S., Isaac, B. J., Raj Neeravi, A.,...Dpm, S. (2022). Hybrid Plasmids Encoding Antimicrobial Resistance and Virulence Traits Among Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST2096 in India. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 12, 875116-875116. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.875116>
- Shelenkov, A., Slavokhotova, A., Mikhaylova, Y., Akimkin, V., Shelenkov, A., Slavokhotova, A.,...Akimkin, V. (2025). Genomic typing, antimicrobial resistance gene, virulence factor and plasmid replicon database for the important pathogenic bacteria *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Microbiology* 2024 25:1, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03720-8>
- 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. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600589>
- Tang, Y., Fu, P., Zhou, Y., Xie, Y., Jin, J., Wang, B.,...Jiang, X. (2020). Absence of the type I-E CRISPR-Cas system in *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 is associated with dissemination of IncF epidemic resistance plasmids in this clonal complex. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(4), 890-895. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKZ538>
- Tsang, K. K., Lam, M. M. C., Wick, R. R., Wyres, K. L., Bachman, M., Baker, S.,...Group, K.-G. A. G.-P. (2024). Diversity, functional classification and genotyping of SHV β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Genomics*, 10(10). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001294>
- Vanegas, J. M., & Jiménez, J. N. (2020). Resistencia antimicrobiana en el siglo XXI: ¿hacia una era postantibiótica? *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 38(1). <https://doi.org/10.17533/UDEA.RFNSP.V38N1E337759>
- Varela, Y. (2019). Fenotipo hiper mucoviscoso de *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta: Lo nuevo de un viejo enemigo.
- Wang, G., Song, G., & Xu, Y. (2020). Association of *crispr/cas* system with the drug resistance in *klebsiella pneumoniae*. *Infection and Drug Resistance*, 13, 1929-1935. <https://doi.org/10.2147/IDR.S253380>
- Wang, S., Ding, Q., Zhang, Y., Zhang, A., Wang, Q., Wang, R.,...Wang, H. (2022). Evolution of Virulence, Fitness, and Carbapenem Resistance Transmission in ST23 Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with the Capsular Polysaccharide Synthesis Gene *wcaJ* Inserted via Insertion Sequence Elements. *Microbiology Spectrum*, 10(6). https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.02400-22/SUPPL_FILE/SPECTRUM.02400-22-S0002.PDF
- Wasfi, R., Elkhatib, W. F., & Ashour, H. M. (2016). Molecular typing and virulence analysis of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates recovered from Egyptian hospitals. <https://doi.org/10.1038/srep38929>

- Wen, S., Feng, D., Chen, D., Yang, L., & Xu, Z. (2020). Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104205>
- Xue, C., & Sashital, D. G. (2019). Mechanisms of Type I-E and I-F CRISPR-Cas Systems in Enterobacteriaceae. *EcoSal Plus*, 8(2). https://doi.org/10.1128/ECOSALPLUS.ESP-0008-2018/ASSET/E834576A-2770-49DE-9255-7A993B48F08F/ASSETS/GRAPHIC/ESP-0008-2018_FIG_008.GIF
- Zhanel, G. G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D. J.,...Karlowsky, J. A. (2012). Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs*, 67(7), 1027-1052. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767070-00006>
- Zhang, M., Li, J., Lu, Y., Wu, W., Wu, J., Xu, Y.,...Huang, W. (2021). Expanding of st11 carbapenemase-producing klebsiella pneumoniae subclones in a Chinese Hospital, Shenzhen, China. *Infection and Drug Resistance*, 14, 1415-1422. <https://doi.org/10.2147/IDR.S299478>
- Zhou, Y., Tang, Y., Fu, P., Tian, D., Yu, L., Huang, Y.,...Jiang, X. (2020). The type I-E CRISPR-Cas system influences the acquisition of blaKPC-IncF plasmid in *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1), 1011-1022. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1763209>

Apéndices

Apéndice A. Caracterización fenotípica y molecular de los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*.

COD	Perfil de Resistencia	<i>bla_{SHV}</i>	<i>bla_{KPC}</i>	<i>fimH1</i>	CRISPR	Espaciadores
K01	CFZ, GE, AMP, CXM, FEP, CRO, SAM, SXT, LEV, CIP, CAZ	Pos	Neg	Pos	I-E*	Fago
S112	CFZ, AMP, TZP, SAM	Pos	Neg	Neg	I-E	Plásmido
LC092	AMP, LEV, CIP, F	Pos	Neg	Pos	I-E	Plásmido
LC072	SXT	Pos	Neg	Pos	I-E*	Plásmido
S58	AMP	Pos	Neg	Pos	I-E*	Plásmido
S65	AMP	Pos	Neg	Pos	I-E*	NA*
LC053	AMP	Pos	Neg	Pos	I-E	NA*
K09	AMP	Pos	Neg	Pos	I-E*	Plásmido
C003	AMP	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
C007	CFZ, GE, AMP, CXM, FEP, CRO, TZP, SAM, AK, SXT, LEV, CIP, CAZ, F	Pos	Neg	Neg	Neg	NA
C010	AMP	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
C020	CFZ, GE, AMP, CXM, CAZ	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
S06	CFZ, GE, AMP, CXM, FEP, CRO, TZP, SAM, AK, SXT, LEV, CIP, CAZ, F	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
S07	AMP, F	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
S08	CFZ, GE, AMP, CXM, CRO, SXT, CIP	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
S19	CFZ, GE, AMP, CXM, SAM, SXT, CIP	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
S40	AMP	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
S44	CFZ, GE, AMP, CXM, SAM, SXT, CIP, CAZ	Pos	Neg	Pos	Neg	NA
S61	AMP, SXT	Neg	Pos	Pos	Neg	NA

S64	AMP	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
S68	CFZ, AMP, CXM, CRO, SAM, SXT, CIP, CAZ, F	Pos	Pos	Neg	Neg	NA
S150	CFZ, GE, AMP, CXM, FEP, CRO, SAM, SXT, CIP, CAZ	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
LC003	AMP (I)	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
LC005	AMP	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
LC030	AMP	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
LC077	AMP	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
LC106	AMP	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
LC112	AMP, F (I)	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
LC122	AMP	Pos	Pos	Neg	Neg	NA
K02	CFZ, AMP, CXM, FEP, CRO, TZP, SAM, SXT, CAZ, F	Pos	Neg	Pos	Neg	NA
K07	CFZ, GE, AMP, CXM, FEP, CRO, TZP, SAM, AK, SXT, LEV, CIP, CAZ, F	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
K08	AMP, CEFURO, F	Pos	Pos	Neg	Neg	NA
K11	CFZ, AMP, CXM, CRO, SAM, AK	Pos	Pos	Pos	Neg	NA
K12	CFZ, AMP, SAM, SXT, CIP	Pos	Pos	Neg	Neg	NA

Nota. **COD** corresponde al código único asignado a cada aislamiento. **(I)** corresponde a aquellos antibióticos que mostraron una resistencia intermedia. **Pos** corresponde a los aislamientos positivos para el gen analizado. **Neg** corresponde a los aislamientos negativos para el gen analizado. **NA** corresponde a aquellos aislamientos que no tenían sistema CRISPR por lo tanto no fue posible realizar la identificación de los espaciadores. **NA*** corresponde a los aislamientos CRISPR positivos con los cuales no fue posible identificar los espaciadores. LC122 corresponde al aislamiento que proviene de una úlcera de piel.

Apéndice B. Alineamiento de secuencia del arreglo CRISPR de un aislamiento de *K. pneumoniae* de Colombia con un aislamiento de Taiwán.

Klebsiella pneumoniae strain LAhvKp198-2017 chromosome, complete genome

Sequence ID: [CP176888.1](#) Length: 5453196 Number of Matches: 26

Range 1: 3443426 to 3443742 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand		
586 bits(317)	8e-163	317/317(100%)	0/317(0%)	Plus/Plus		
Query 86	TGCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCTACACCCAGCTCTTTGACGCAAAGGCTCAGG				145	
Sbjct 3443426	TGCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCTACACCCAGCTCTTTGACGCAAAGGCTCAGG				3443485	
Query 146	AGGCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCTCCTTGTTTCGTTTCTTCTGATGTTTGCAA				205	
Sbjct 3443486	AGGCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCTCCTTGTTTCGTTTCTTCTGATGTTTGCAA				3443545	
Query 206	GGCGTCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCTGTTGACGTATGCCGTGATGCTGCTGG				265	
Sbjct 3443546	GGCGTCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCTGTTGACGTATGCCGTGATGCTGCTGG				3443605	
Query 266	TAGGGTCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCCGCTGTATGCCCCCATCCTTCGCAAGC				325	FEATURES source Location/Qualifiers 1..5453196 /organism="Klebsiella pneumoniae" /mol_type="genomic DNA" /strain="LAhvKp198-2017" /isolation_source="liver" /host="Homo sapiens" /db_xref="taxon:573" /geo_loc_name="Taiwan" /lat_lon="25.04115344 N 121.51916650 E"
Sbjct 3443606	TAGGGTCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCCGCTGTATGCCCCCATCCTTCGCAAGC				3443665	
Query 326	ACTACGCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCCGATGACAACCTTTCCTACTTCGCTGC				385	
Sbjct 3443666	ACTACGCTTCCCCACGCACGTGGGGGTGTTTCCGATGACAACCTTTCCTACTTCGCTGC				3443725	
Query 386	GCTGGCGTCTTCCCCAC 402					
Sbjct 3443726	GCTGGCGTCTTCCCCAC 3443742					

Nota. Alineamiento de secuencia del arreglo CRISPR2 del aislamiento S58 donde se obtiene un 100% de identidad con la secuencia cromosomal *Klebsiella pneumoniae* strain LAhvKp198-2017 (CP176888.1) originaria de Taiwán.