



# **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

---

**Facultad de medicina**

**Licenciatura en Biomedicina**

**Eje de Microbiología**

**Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas ICUAP**

**Título de la tesis:**

**“Determinación fenotípica y molecular de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de diferentes hospitales mexicanos”.**

**Título a obtener:**

**Licenciado en Biomedicina**

**Nombre del alumno que la presenta:**

***Marco Arturo Pérez Sánchez***

**Directora de tesis:**

**D. en C. Patricia Lozano Zarain**

**Asesores metodológicos:**

**Dra. Margarita M.P. Arenas Hernández**

**Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia**

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

- A mi alma mater, la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, con la cual estaré agradecido toda la vida por desarrollarme durante cinco años y permitirme cumplir mis objetivos con ayuda de su infraestructura y cuerpo institucional de excelente calidad.
- A la **Facultad de Medicina** y la **Licenciatura en Biomedicina**, por todas las atenciones y el apoyo brindado para la culminación de esta tesis y principalmente por enseñarme lo maravilloso que es estudiar la vida, sus aulas y jardines ahora son parte de mi historia.
- Al **Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas** y al **Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad**, por brindarme la oportunidad de formarme en el campo de la microbiología y realizar mi tesis en sus instalaciones.
- A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado**, por los apoyos de financiamiento otorgados durante la realización de esta tesis a los proyectos VIEP: 100031833-VIEP2018 y 100031833-VIEP-2019.
- A los colaboradores y Hospitales que donaron cepas bacterianas estudiadas en este trabajo de tesis: **M. C. Zita Gutiérrez Cazares (Hospital para el Niño Poblano)**, **Qfb. Guadalupe Jiménez Flores (H. R. I.S.S.S.T.E. Puebla)**, **Qfb. Samuel Treviño Mora (Lab. Clínico Especializado “Los Ángeles”)**, **Dr. César Raúl González Bonilla (H. G. R. No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla)** y **Hospital I.S.S.S.T.E.P.**

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

- A la **D. en C. Patricia Lozano Zarain**, por haberme aceptado en su grupo de trabajo para la realización de esta tesis y por guiarme de la mejor manera en todo momento en este largo camino, pero sobre todo por ser una gran persona y enseñarme que los valores también se trabajan en el laboratorio. Muchas gracias por TODO.
- A la **Dra. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por todas las atenciones prestadas y enseñanzas durante mi paso por el laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad y por sus valiosas revisiones y comentarios que enriquecieron a esta tesis.
- A la **Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández**, por su valioso aporte a mi formación profesional durante mi etapa como estudiante y por el apoyo y la disponibilidad para revisar esta tesis y enriquecerla en gran medida.
- A todos los **profesores** de la Facultad de Medicina, del Instituto de Fisiología y del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas que se cruzaron en mi camino, que me compartieron parte de su conocimiento y me motivaron a seguir estudiando la vida. "La ciencia se nutre a sí misma, se cuestiona, depura y acumula con el paso del tiempo".

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- A mis abuelos **Juan y Chucho** a quienes perdí físicamente durante este proceso. Ustedes me enseñaron que el trabajo y la preparación constante son las mejores armas para afrontar la vida. Sus valores y principios persistirán en mí para siempre.
- A mis abuelas **Muñe y Choche** por estar siempre al tanto de mi formación y apoyarme en todo momento. Su amor a la familia y la valentía para cuidar de todos me han enseñado mucho.
- A mis **tíos y primos** por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, porque sé que puedo confiar en cualquier momento en ustedes y que recibiré las atenciones como si de un hijo o un hermano se tratase.
- A mi novia **Scarlett** por aventurarse a compartir conmigo este camino y ser parte de esta maravillosa etapa. Todos esos días de espera en las mesitas han valido la pena. Gracias por siempre apoyar mis sueños y locuras ¡Te amo!
- A mi 2ª familia durante estos últimos 3 años, mis **compañeros del Lab. de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad**, de los cuales me llevo grandes anécdotas, vivencias y aprendizajes que siempre recordaré. A **Elenita** por ser mi mentora y ayudarme a ser mejor cada día. A **Jessi, Yess, Cristi, Edwin, Alma, Eder y Gerardo** por todos los consejos y el tiempo que dedicaron a enseñarme cosas nuevas. A **Miranda, René, Diana, Michelle, Midory, César, Brenda, Mariela, Pato, Flor, Suemy, Ceci y Lore** por tantos convivios y salidas que hicieron más ameno mi paso por el laboratorio. A **Dianita** donde quiera que te encuentres, por permitirme conocerte y compartir conmigo lo que más te gustaba hacer.
- A mis **compañeros de la generación 2014**, en especial a todos los del eje de microbiología por los grandes momentos vividos a su lado.

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis papás, **Dona** y **Santy** por su inmenso amor, por darme todo en la vida y por apoyarme siempre para terminar mis estudios, a mi hermana **Ale** que me ha enseñado muchas cosas además de siempre apoyarme en lo que hago, a mi hermana **Karen** y su esposo **Lalo** que siempre han mostrado interés por lo que hago y de igual forma siempre me apoyan en lo que hago, y al nuevo integrante de la familia: **Fer** que ha llegado a alegrar nuestras vidas. Gracias por creer en mí ciegamente, apoyarme incondicionalmente y alentarme durante todo este tiempo para conseguir mis objetivos. Son lo más importante para mí, este logro es de todos nosotros y sé que juntos conseguiremos muchos más.

*Marco Arturo Pérez Sánchez*

*La mayoría de los hombres, Kamala, son como las hojas que caen y revolotean indecisas, en el aire, antes de ir a parar al suelo. Otros, son más bien como los astros: siguen una ruta fija, ningún viento los alcanza y llevan en su interior su propia ley y su trayectoria.*

*Siddhartha, Hermann Hesse*

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
2.1. Resistencia Antimicrobiana e Infecciones Asociadas a la Atención de Salud .	2
2.2. El género <i>Klebsiella</i> y su importancia clínica. ....	4
2.2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> clásica (cKP) .....	5
2.2.2. Cepas hipervirulentas de <i>K. pneumoniae</i> (hvKP).....	6
2.2.3. <i>Klebsiella oxytoca</i> .....	6
2.3. Mecanismos de Resistencia antimicrobiana en <i>Klebsiella</i> spp.....	7
2.3.1. Resistencia a Betalactámicos .....	8
2.3.2. Resistencia a fluoroquinolonas .....	10
2.3.3. Resistencia a aminoglucósidos.....	11
2.3.4. Resistencia en cepas hvKP .....	11
<b>3. ANTECEDENTES .....</b>	<b>13</b>
3.1. Antecedentes generales .....	13
3.2. Antecedentes específicos .....	16
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>18</b>
<b>5. JUSTIFICACION .....</b>	<b>19</b>
<b>6. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	20
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....	20
<b>7. MATERIAL Y METODOS.....</b>	<b>21</b>
7.1. Hipótesis científica.....	21
7.2. Diseño del estudio .....	21
7.3. Ubicación Espacio-Temporal .....	21
7.4. Muestreo .....	21
7.4.1. Definición de la Unidad de Población .....	21
7.4.2. Selección de la muestra .....	22
7.4.3. Criterios de selección de las unidades de muestreo .....	22
7.4.4. Diseño y tipo de muestreo .....	22
7.4.5. Tamaño de la muestra.....	22
7.5. Definición de las variables y escalas de medición.....	22
7.6. Método de recolección de datos .....	24
7.7. Recursos humanos.....	24
7.8. Recursos materiales .....	24
7.9. Recursos financieros .....	24
7.10. Bioética .....	25
7.11. Material Biológico.....	25



7.12.	Crioconservación e Identificación Bacteriana .....	26
7.13.	Determinación del fenotipo hipermucoide.....	26
7.14.	Búsqueda del gen <i>rmpA</i> .....	27
7.15.	Determinación del perfil de resistencia antimicrobiana y Fenotipo AmpC y/o BLEE.....	29
7.15.1.	Fenotipo AmpC y/o BLEE .....	29
7.16.	Identificación de cepas Multidrogorresistentes, Extremodrogorresistentes y Pandrogorresistentes. ....	31
7.17.	Identificación de genes de resistencia.....	32
7.17.1.	Obtención de ADN Bacteriano .....	32
7.17.2.	Amplificación de genes de resistencia por PCR.....	33
7.17.3.	Purificación y Secuenciación de los productos de PCR .....	34
7.17.4.	Análisis Bioinformático de secuencias .....	35
7.17.5.	Primer walking .....	35
7.18.	Perfil plasmídico.....	36
7.19.	Relación Clonal.....	36
7.19.1.	Preparación de insertos.....	37
7.19.2.	Lisis Bacteriana .....	37
7.19.3.	Lavado de los Insertos.....	37
7.19.4.	Digestión Enzimática .....	37
7.19.5.	Preparación del gel de agarosa .....	38
7.19.6.	Electroforesis.....	38
7.19.7.	Tinción de gel y visualización .....	38
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
8.1.	Cepas aisladas de pacientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E Puebla .....	40
8.1.1.	Perfil de sensibilidad.....	41
8.1.2.	Identificación de genes de resistencia .....	45
8.2.	Cepas aisladas de pacientes del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla.....	51
8.2.1.	Perfil de sensibilidad antibiótica .....	51
8.2.2.	Identificación de genes de resistencia .....	52
8.2.3.	Extracción plasmídica de las cepas de <i>Klebsiella</i> aisladas de pacientes del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla. ....	59
8.2.4.	Relación Clonal de las cepas de <i>Klebsiella</i> aisladas de pacientes del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla.....	60
8.3.	Cepas aisladas de pacientes del Hospital I.S.S.S.T.E.P.....	61
8.3.1.	Perfil de sensibilidad.....	61
8.3.2.	Búsqueda de genes de resistencia.....	62
8.4.	Cepas aisladas de pacientes del Hospital para el niño Poblano. ....	62

8.4.1. Perfil de sensibilidad.....	62
8.4.2. Búsqueda de genes de resistencia.....	63
8.5. Laboratorio Clínico Especializado “Los Ángeles” de la ciudad de Puebla. ....	63
8.5.1. Perfil de sensibilidad.....	63
8.5.2. Búsqueda de genes de resistencia.....	64
8.6. Cepas hipermucoides .....	64
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>11. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
<b>12. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>76</b>
<b>13. ANEXOS .....</b>	<b>86</b>



## INDICE DE FIGURAS

# Figura	Título	Página
1.	Localización de los Hospitales y el Laboratorio privado participantes del estudio.	25
2.	Ejemplos del fenotipo hipermucoide positivo en cepas de <i>K. pneumoniae</i> .	27
3.	Alineamiento de nucleótidos de las variantes del gen <i>rmpA</i> reportadas en la base de datos del NCBI e identificación de los oligonucleótidos que se evaluaron para ser usados en este estudio.	28
4.	Distribución de los discos de antibióticos utilizada para la determinación del fenotipo BLEE y/o AmpC y el perfil de resistencia antimicrobiana.	31
5.	Estructura de conservada de un integrón de clase 1 y esquematización de las regiones que se pretendieron amplificar con la estrategia primer walking.	36
6.	Fenotipo BLEE observado en las cepas de <i>K. pneumoniae</i> KpE44, KpE45, KpE46, KpE47, KpE49, y KpE50.	43
7.	Productos de PCR de algunas cepas del Hospital I.S.S.S.T.E. para los genes <i>shv</i> y <i>ctxm-u</i> .	46
8.	Productos de PCR en las que se identificaron genes conservados de un integrón clase I, en la cepa KoE37.	47
9.	Electroforesis en gel de agarosa de la reacción Qac-F/Sul-R.	48
10.	Electroforesis en gel de agarosa de la reacción FRC-int/Vim-R.	49
11.	Características y análisis de la secuencia de un integrón que contiene el gen <i>bla<sub>VIM-2</sub></i> rio arriba del gen <i>int1</i> .	50
12.	Electroforesis en gel de agarosa de la reacción Vim-F/FRC-sul.	51
13.	Productos de PCR de las 6 cepas del Hospital General No.72 I.M.S.S. Tlalnepantla en la que se buscó al gen <i>bla<sub>SHV</sub></i> .	53
14.	Productos de PCR de las 6 cepas del Hospital General No.72 I.M.S.S. Tlalnepantla en la que se buscó al gen <i>bla<sub>TEM</sub></i> .	53
15.	Productos de PCR de las 6 cepas del Hospital General No.72 I.M.S.S. Tlalnepantla en la que se buscó al gen <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> .	54
16.	Productos de PCR de las 6 cepas del Hospital General No.72 I.M.S.S. Tlalnepantla en la que se buscó al gen <i>bla<sub>VIM</sub></i> .	54

17.	Alineamiento de nucleótidos para el análisis bioinformático del gen <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .	56
18.	Alineamiento de nucleótidos para el análisis bioinformático del gen <i>bla</i> <sub>TEM</sub> .	57
19.	Alineamiento de nucleótidos que se llevó a cabo para el análisis bioinformático del gen <i>bla</i> <sub>VIM</sub> encontrados en las cepas KpS1 y KoE37.	58
20.	Productos de PCR del ensayo “primer walking” con la reacción FRC-int/Vim-R llevada a cabo en KpS1 y KoE37.	59
21.	Perfil plasmídico de las cepas del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla.	60
22.	Dendograma UPGMA, PFGE de los patrones de restricción obtenidos con la digestión enzimática <i>Xba</i> 1 y pulsotipo de las cepas aisladas de pacientes del Hospital General No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla.	61

## INDICE DE TABLAS

# Tabla	Título	Página
1.	Variables de población.	23
2.	Variables de estudio.	23
3.	Variables confusoras.	24
4.	Fundamento, características e interpretación de las pruebas bioquímicas utilizadas en el estudio.	26
5.	Características de los oligos evaluados en este estudio.	29
6.	Condiciones de reacción para la amplificación del gen <i>rmpA</i> .	29
7.	Antibióticos y valores de referencia utilizados para la interpretación de los antibiogramas.	30
8.	oligonucleótidos utilizados, condiciones de reacción de PCR Oligonucleótidos utilizados, condiciones de reacción de PCR y tamaño de amplicones esperados de cada reacción de genes de betalactamasas.	33
9.	Cantidades de los reactivos utilizados en cada PCR 1X.	34
10.	Oligonucleótidos y condiciones de las reacciones de PCR de los genes amplificados para la búsqueda de integrones en las cepas KpE37 y KpS1, resistentes a carbapenémicos.	35

11.	Oligonucleótidos que se utilizaron para la estrategia “primer walking” y condiciones a las que se corrieron las reacciones de PCR.	35
12.	Resistotipos encontrados en las cepas de <i>K. pneumoniae</i> aisladas de pacientes del hospital I.S.S.S.T.E.	44
13.	Perfil de resistencia y fenotipos observados en las 4 cepas de <i>K. oxytoca</i> aisladas de pacientes del Hospital Regional del I.S.S.S.T.E. Puebla.	45
14.	Perfil de resistencia y fenotipos observados en las 6 cepas aisladas de pacientes del Hospital General No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla.	52
15.	Perfil de resistencia y fenotipos observados en las cepas aisladas de pacientes del I.S.S.S.T.E.P.	62
16.	Perfil de resistencia y fenotipos observados en las cepas aisladas de pacientes del H.N.P.	63
17.	Perfil de resistencia y fenotipos observados en las cepas aisladas de pacientes del Laboratorio Clínico.	63
18.	Datos principales de las cepas hipermucoides.	65

## INDICE DE GRAFICAS

# Grafica	Título	Página
1.	Principales servicios hospitalarios de aislamiento de las cepas de <i>Klebsiella</i> spp. aisladas del hospital I.S.S.S.T.E.	40
2.	Sitio anatómico de aislamiento de las cepas de <i>Klebsiella</i> spp. del Hospital regional del I.S.S.S.T.E.	41
3.	Perfil de resistencia de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> del Hospital Regional I.S.S.S.T.E para cada uno de los 20 antibióticos probados en el estudio.	42
4.	Fenotipos observados en las cepas de <i>K. pneumoniae</i> del hospital I.S.S.S.T.E.	42

## ABREVIATURAS

<b>AmpC</b>	Betalactamasa tipo Ampicilinas C
<b>BHI</b>	Infusión Cerebro–Corazón
<b>BLEE</b>	Betalactamasa de espectro extendido
<b>CICM</b>	Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
<b>cKP</b>	Cepas clásicas de <i>K. pneumoniae</i>
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>EARS-Net</b>	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EMAG</b>	Enzimas modificadoras de aminoglucósidos
<b>hvKP</b>	Cepas hipervirulentas de <i>K. pneumoniae</i>
<b>IAAS</b>	Infecciones asociadas a la atención de salud
<b>ICUAP</b>	Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
<b>ITU</b>	Infecciones del tracto urinario
<b>LHMyC</b>	Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad
<b>MBL</b>	Metalo-betalactamasa
<b>MDR</b>	Multidrogo-resistente
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDR</b>	Pandrogo-resistente
<b>PFGE</b>	Electroforesis en gel de campos pulsados
<b>QRDR's</b>	Regiones determinantes de resistencia a quinolonas
<b>RHOVE</b>	Red hospitalaria de vigilancia epidemiológica
<b>SE</b>	Buffer sal y EDTA
<b>SSI</b>	Solución salina isotónica
<b>ST</b>	Secuencia tipo
<b>TAE</b>	Buffer Tris-Acetato-EDTA
<b>TBE</b>	Buffer Tris-Borato-EDTA
<b>TE</b>	Buffer Tris-EDTA
<b>TSA</b>	Agar soya tripticaseína
<b>UCIN</b>	Unidad de cuidados intensivos neonatales
<b>XDR</b>	Extremodrogo-resistente

## 1. RESUMEN

El género *Klebsiella* es ubicuo, todas las especies son capaces de colonizar el ser humano y causar enfermedades, principalmente infecciones nosocomiales. *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* son las especies de mayor importancia clínica, responsables de una amplia gama de infecciones y portadoras de muchos genes de resistencia a los antibióticos. En *K. pneumoniae* se han identificado 2 patotipos: las "cepas clásicas", que causan infecciones intrahospitalarias y que comúnmente presentan resistencia a los antibióticos y las "cepas hipervirulentas", que causan infecciones de la comunidad en pacientes sanos y jóvenes, y que tienen como principal distintivo un fenotipo hipermucoide.

En este estudio se determinó la resistencia antimicrobiana en cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de diferentes hospitales mexicanos.

Se recolectaron 75 cepas provenientes de 4 hospitales y de un Laboratorio privado de la ciudad de Puebla y México. Se llevó a cabo la identificación del género (ViteK-2 y pruebas bioquímicas), determinación del fenotipo hipermucoide (prueba de cuerda), determinación del fenotipo BLEE y/o AmpC y de la susceptibilidad antimicrobiana (Kirby-Baüer), búsqueda de genes de resistencia (PCR y secuenciación), identificación del perfil plasmídico en algunas cepas de interés (Kieser) y relación clonal (PFGE- Xba-1).

Se identificaron 69 cepas de *K. pneumoniae* y 6 de *K. oxytoca*. 94.2% (65/69) de las cepas de *K. pneumoniae* fueron resistentes a betalactámicos, 88.4% (61/69) a aminoglucósidos, 85.5% (59/69) a tetraciclinas, 81.1% (56/69) a sulfamidas, 69.5% (48/69) a quinolonas y 26% (18/69) a fenicoles. Mientras que en *K. oxytoca* el 100% de las cepas (6/6) fueron resistentes a betalactámicos y aminoglucósidos, 50% (3/6) a tetraciclinas y sulfonamidas, 16.6% (1/6) a fenicoles y quinolonas. El 65.2% (43/69) de las cepas de *K. pneumoniae* fue resistente a cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y quinolonas al mismo tiempo. Se observó en un 69.3% (52/75) de todas las cepas el fenotipo BLEE, mientras que el fenotipo AmpC no se observó en ninguna cepa. El gen *bla<sub>SHV</sub>* se encontró en un 93.3% (69/75) de las cepas; el gen *bla<sub>TEM</sub>* en el 80% (60/75); el gen *bla<sub>CTX-M</sub>* en el 72% (54/75). En 3 cepas de *K. oxytoca* y 5 de *K. pneumoniae* resistentes a los carbapenémicos se encontró el gen *bla<sub>VIM</sub>*, identificando la variante *bla<sub>VIM-23</sub>* asociado a un integrón de clase 1 en dos de estas cepas. Las cepas del Hospital I.M.S.S. compartieron semejanzas en el perfil plasmídico y presentaron similitudes muy cercanas en la relación clonal. Nueve cepas tanto de origen hospitalario como de origen comunitario fueron positivas para el fenotipo hipermucoide y en ninguna de ellas se identificó al gen *rmpA* como el responsable de la hiperproducción capsular.

Se encontraron cepas multidrogoresistentes de *K. pneumoniae* y de *K. oxytoca* causantes de infecciones nosocomiales y portadoras de los genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>CTX-M</sub>*. En dos cepas se identificó la variante *bla<sub>VIM-23</sub>* posiblemente relacionada a un integrón de clase 1. Las cepas de *K. pneumoniae* del Hospital General I.M.S.S. estuvieron estrechamente relacionadas, y tuvieron el mismo perfil plasmídico, pudiendo haber sido parte de un brote nosocomial. Las cepas hipermucoides aisladas de infecciones comunitarias fueron sensibles a los antibióticos, mientras que las de infecciones nosocomiales presentaron resistencia antimicrobiana, hallazgo de especial interés por el riesgo que representan en el ambiente intrahospitalario.

**Palabras clave:** *Klebsiella* spp., fenotipo de resistencia, cepas hipermucoides.

## **2. INTRODUCCIÓN**

Las especies del género *Klebsiella* spp. son bacterias oportunistas, que se caracterizan por causar infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Podschun y Ullman, 1998). Las características predisponentes para una infección nosocomial causada por este género son: estar en los extremos de edad, especialmente neonatos y ancianos; alcoholismo crónico, diabetes mellitus, enfermedad cardíaca, renal, pulmonar crónica, neoplásica o estar cursando con alguna otra infección (Brisse *et al.*, 2006). Causan severas infecciones nosocomiales como: Infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario (ITU), infecciones del torrente sanguíneo, sepsis entre otras (Rebekah y Michael, 2018; Shon *et al.*, 2013). Las cepas intrahospitalarias tienen la capacidad de diseminarse rápidamente causando brotes nosocomiales, especialmente en las unidades neonatales (Brisse *et al.*, 2006), y generalmente las infecciones que causan son difíciles de tratar por la alta resistencia antimicrobiana que presentan, debido a la selección natural ejercida por el uso de antibióticos en la práctica médica.

### **2.1. Resistencia Antimicrobiana e Infecciones Asociadas a la Atención de Salud**

Los antibióticos son fundamentales para luchar contra enfermedades del ser humano y de los animales; sin embargo, debido a un abuso y mal uso de ellos, en los últimos años se han reportado niveles alarmantes de resistencia antimicrobiana en países de todo el mundo sin importar su desarrollo, riqueza o posición geográfica. Las enfermedades causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos causan alrededor de 700 000 muertes al año en todo el mundo, y se calcula que para el año 2050, si se mantiene la tasa de crecimiento podrían causar la muerte de 10 millones de personas (Banco Mundial, 2017). Es por esta razón que la OMS y la ONU consideran la emergencia de la resistencia antimicrobiana como una crisis de salud mundial que pone en riesgo un siglo de avances en materia de salud (Quiñones, 2017; OMS, 2016). Enfermedades comunes que anteriormente eran tratadas y eliminadas de forma sencilla se han vuelto intratables, y los procedimientos

médicos que salvan vidas conllevan mayores riesgos (Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance [IACG], 2019).

Las Infecciones Asociadas a la Atención de Salud (IAAS) o también llamadas nosocomiales o intrahospitalarias, son definidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “aquellas infecciones contraídas por un paciente durante su tratamiento en el hospital u otro centro sanitario y que dicho paciente no tenía ni estaba incubando en el momento de su ingreso, incluyendo también, las infecciones que se contraen en el hospital, pero se manifiestan después del alta; así como las infecciones ocupacionales del personal del centro sanitario” (Allegranzi *et al.*, 2011). Además, el mayor porcentaje de las IAAS son causadas por bacterias multidrogo-resistentes, y provocan efectos como son: aumento en el tiempo de hospitalización de entre 5.9 y 9.6 días y un incremento en la probabilidad de morir hasta en un 6.9%. A pesar de que se conoce que las IAAS son el evento desfavorable más frecuente en la atención sanitaria, su verdadera frecuencia mundial aún no se conoce con exactitud debido a la dificultad de reunir datos (Rodríguez, 2018).

Ante el escenario cada vez más difícil provocado por la resistencia antimicrobiana y el elevado número de IAAS en todo el mundo, en mayo del 2015 la 68ª Asamblea Mundial de la Salud adoptó el plan de acción mundial sobre la resistencia a los antibióticos (OMS, 2016) en el que se tomaron medidas y se acordaron acciones por parte de todos los países miembros de la OMS; y derivado de estas acciones emprendidas para frenar la propagación de microorganismos resistentes a los antibióticos, se publicó en el año 2017 la primera lista de “patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos” (Quiñones, 2017) sobre los que recae la necesidad de promover la investigación. Se enfatizó en tres niveles de prioridad y entre los microorganismos más importantes se encuentran:

- Prioridad 1: CRITICA. -*A. baumannii* y *P. aeruginosa* resistente a los carbapenémicos, Familia *Enterobacteriaceae* (entre las que se encuentra *Klebsiella* spp.) resistentes a los carbapenémicos y productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

- Prioridad 2: ELEVADA. - *S. aureus* resistente a la meticilina con sensibilidad intermedia y resistente a la vancomicina, *H. pilory* resistente a la claritromicina, *Campylobacter* spp. resistente a las fluoroquinolonas, entre otras
- Prioridad 3: MEDIA. - *S. pneumoniae* resistente a la penicilina, *H. influenzae* resistente a la ampicilina y \**Shigella* spp. resistente a las fluoroquinolonas.

## 2.2. El género *Klebsiella* y su importancia clínica.

El género bacteriano *Klebsiella* es de naturaleza ubicua (Podschun y Ullman, 1998), pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son microorganismos fermentadores, no esporulantes, de forma bacilar, productores de cápsula, no móviles y de tinción Gram-negativa (Li *et al.*, 2014). Coloniza un amplio rango de hospederos incluyendo: plantas, en las que desempeña un papel como fijadora de nitrógeno y promotora del crecimiento; y mamíferos, en los que forma parte de la microbiota normal, siendo la mucosa nasofaringe y la gastrointestinal los principales sitios de su colonización (Calfee, 2017; Paczosa y Mecsas, 2016).

El género ha sido modificado y replanteado en más de una ocasión debido a la complejidad de sus características y lo diversificado que se encuentra. Continúa en discusión, pero en consenso son 6 especies y 7 subespecies las que son consideradas parte del género:

- *K. pneumoniae* (Kp).

En esta especie actualmente se reconocen dos variantes: las cepas clásicas y las cepas hipervirulentas, y tres subespecies:

- o *Kp. subsp. pneumoniae*
- o *Kp. subsp. ozaenae*
- o *Kp. subsp. rhinoscleromatis*

- *K. oxytoca* (Ko).

Esta especie se divide en 7 filogrupos: Ko1, Ko2, Ko3, Ko4, Ko6, Ko7, Ko8.

- *K. varicola* (Kv).

- o *Kv. subsp. varicola*
- o *Kv. subsp. tropicalensis*

- *K. quasipneumoniae* (Kq).

- o *Kq. subsp. quasipneumoniae*

o *Kq. subsp. similipneumoniae*

- *K. granulomatis*
- *K. michiganensis*

Todas las especies del género son capaces de causar algún tipo de infección en el ser humano; sin embargo, las especies de mayor importancia clínica por el número de infecciones que causan y su resistencia intrínseca a muchos antibióticos, son *K. oxytoca* y *K. pneumoniae*. Esta segunda especie se encuentra incluida en el grupo ESKAPE (Denkovskienė *et al.*, 2019), que engloba a patógenos nosocomiales en los que se ha presentado un alza importante en los reportes de resistencia a los antimicrobianos en los últimos años y que suponen un riesgo potencial para la salud humana en el futuro ante un escenario complicado que se ha nombrado como “la era post-antibiótica”, en la que no habrá opciones de tratamiento para infecciones que hoy en día son fáciles de tratar (Broberg *et al.*, 2014).

### 2.2.1. *Klebsiella pneumoniae* clásica (cKP)

Es la especie del género que causa más infecciones y por lo tanto la más estudiada. En muchos reportes de vigilancia epidemiológica de IAAS alrededor del mundo, esta bacteria está ubicada como el segundo agente causal más frecuente de ITU (Lorente *et al.*, 2005; Mazzariol *et al.*, 2017) y se encuentra dentro de las primeras 5 causas más frecuentes de neumonía, bacteriemia, infección de sitio quirúrgico, infección de tejidos blandos e infección asociada a dispositivos (catéter, ventilador, sonda, etc.) (Magill *et al.*, 2014; Laupland *et al.*, 2007; Podschun y Ullman, 1998; Chetcuti *et al.*, 2014; Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica [RHOVE], 2017). En cuanto a los estudios de vigilancia epidemiológica que se llevan a cabo en México, en el informe de la RHOVE del año 2015, se colocó a *K. pneumoniae* como el tercer agente etiológico causante de IAAS en el país, y se reporta una tendencia ascendente en los últimos 5 años; siendo el segundo microorganismo más aislado en unidades de terapia intensiva pediátrica y el más aislado en unidades de terapia intensiva neonatal (RHOVE, 2017).

### 2.2.2. Cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* (hvKP)

A mediados de los años 80's se reportaron por primera vez en Taiwán infecciones por *K. pneumoniae* de características nunca antes vistas. Los afectados eran pacientes jóvenes sin antecedentes de enfermedad, las infecciones causadas eran del tipo sistémicas (meningitis, absceso hepático, endoftalmitis) y regularmente se diseminaba a otras regiones del cuerpo; además, estas cepas presentaban una notable sensibilidad a los antibióticos acompañado de una exacerbada producción de cápsula que le confería un fenotipo hipermucoide en placas de agar. Este tipo de cepas comenzaron a ser reportadas como *K. pneumoniae* hipervirulenta (hvKP) (Catalán *et al.*, 2017; Fazili *et al.*, 2016; Struve *et al.*, 2015). El fenotipo hipermucoide generalmente está determinado por "la prueba de cuerda". La prueba de cuerda es positiva cuando se forma una cuerda viscosa > 5 mm de longitud estirando colonias bacterianas crecidas en una placa de agar (Fang *et al.*, 2004). La producción de capsula es el factor de patogenicidad más importante de *K. pneumoniae* ya que le ayuda a evadir la respuesta inmune. En las cepas hipervirulentas se ha observado, que cuentan con genes que exacerbaban los niveles de producción capsular, el gen responsable del fenotipo mucoide o *rmpA* por sus siglas en inglés, es uno de ellos y codifica para un activador transcripcional del cluster de genes que se encargan de sintetizar la cápsula y es acarreado en un plásmido que cuenta con otros genes que podrían estar implicados en la hipervirulencia (Paczosa y Meccas, 2016; Li *et al.*, 2014). Aunque se han notificado varios casos de hvKP en Europa y América, la propagación epidémica se produjo principalmente en países asiáticos, incluidos Taiwán, China, Corea del Sur e Irán.

### 2.2.3. *Klebsiella oxytoca*

A diferencia de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* no figura dentro de los primeros agentes causales de IAAS, se ha calculado que la relación de las infecciones que causan estas especies es de 4 a 1 (Brisse *et al.*, 2006), respectivamente. Los estudios de vigilancia epidemiológica llevados a cabo en México por la Dirección General de Epidemiología en su informe del año 2015 (RHOVE, 2017) coloca a *K. oxytoca* como el agente etiológico número 17 causante de IAAS,

estando presente en infecciones como neumonías, bacteriemia, ITU, infección de sitio quirúrgico e infección de tejidos blandos. De igual forma las tasas de resistencia en esta bacteria se han visto incrementadas y recientemente se demostró que *K. oxytoca* es el agente causal de la colitis hemorrágica asociada a antibióticos (AAHC), en la que se genera un desequilibrio en la microbiota intestinal después de la administración de antibióticos, que es aprovechada por *K. oxytoca* para desatar su potencial patogénico haciendo uso de citotoxinas (Herzog *et al.*, 2014; Darby *et al.*, 2014).

### **2.3. Mecanismos de Resistencia antimicrobiana en *Klebsiella* spp.**

Las especies del género *Klebsiella* son un reservorio de genes de resistencia antimicrobiana, que pueden propagarse a otras bacterias Gram-negativas. Muchos de los genes de resistencia antimicrobiana que ahora se encuentran comúnmente en organismos resistentes a múltiples antibióticos se describieron por primera vez en *Klebsiella* spp. (Bengoechea y Sa Pessoa, 2019). De igual forma se ha demostrado que *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* comparten genes de resistencia antimicrobiana a través de transferencia horizontal para facilitar su adaptación a nuevos entornos (Moradigaravand *et al.*, 2017). En el 2018 más de la tercera parte de los aislados de *K. pneumoniae* reportados a la Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (EARS-Net) (European Center for Disease Prevention and Control [EARS], 2018) fueron resistentes a al menos una familia de antimicrobianos, siendo la resistencia combinada a las cefalosporinas de tercera generación, a aminoglucósidos y a fluoroquinolonas el fenotipo más común.

Las enterobacterias cuentan con diversas estrategias para llevar a cabo la resistencia a los antimicrobianos y estos están basados, en uno o varios de los siguientes mecanismos que pueden coexistir en la misma bacteria (Medina, 2011):

Inactivación Enzimática: La inactivación se produce por la producción de enzimas codificadas por genes cromosómicos o extracromosómicos que alteran la estructura química del antimicrobiano.

Modificación de las moléculas diana: Estas modificaciones normalmente se deben a mutaciones que alteran el sitio de unión de los antimicrobianos, impidiendo así su actividad.

Disminución de la permeabilidad celular: Este mecanismo provoca la disminución de la entrada del antimicrobiano, causada por modificaciones en el patrón de la expresión de porinas resultado del estrés inducido por la presencia de los antibióticos que termina por activar reguladores transcripcionales y post-transcripcionales que generan una disminución en la expresión de las porinas de la pared celular o una alteración en la afinidad química de estas, y un aumento en la expresión de proteínas de membrana especializadas (bombas de eflujo) que disminuyen la entrada del antimicrobiano (Masi *et al.*, 2019). Puede afectar a muchas clases de antimicrobianos simultáneamente, como, por ejemplo, producir una resistencia múltiple tanto a agentes hidrofílicos, como a los compuestos que comparten alguna estructura en particular.

Expulsión de agentes antimicrobianos: La expulsión se realiza mediante transportadores o bombas de expulsión activas ubicadas en la membrana interna de los microorganismos que impiden que el antimicrobiano se acumule en el interior de la célula sacándolo fuera de ésta.

### **2.3.1. Resistencia a Betalactámicos**

Los betalactámicos son antibióticos bacteriolíticos que contienen un anillo betalactámico en su estructura y que actúan inhibiendo la síntesis de la barrera de peptidoglucanos de la pared celular. Las estrategias implicadas en la resistencia a betalactámicos por parte de enterobacterias incluyen: la disminución de la permeabilidad celular y la expulsión activa; sin embargo, la hidrólisis de betalactámicos por medio de enzimas es el mecanismo de resistencia más común. Esto puede ser llevado a cabo por los siguientes mecanismos:  $\beta$ -lactamasas tipo AMP-C, BLEE's y Carbapenemasas.

- Las betalactamasas tipo AMP-C son enzimas que según la clasificación estructural de Ambler están dentro de las serin-betalactamasas y de acuerdo con la clasificación funcional de Bush pertenecen al Grupo 1 (Ambler, 1980; Bush y Jacoby, 2010). Estas  $\beta$ -lactamasas se caracterizan por ser resistentes

a inhibidores, ser activas sobre aztreonam, cefamicinas y cefalosporinas de primera, segunda generación y en menor medida a cefalosporinas de tercera generación.

- Las BLEE's son el mecanismo de resistencia más común en el género *Klebsiella*. Estas enzimas se encuentran dentro del grupo 2 que contiene las serin betalactamasas, y según la actual clasificación funcional de Bush, pueden ser inhibidas por ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Bush y Jacoby, 2010; Philippon y Arlet, 1994). Las BLEE's más comunes son TEM, SHV, CTX-M y OXA, las cuales hidrolizan penicilinas, cefalosporinas de primera y tercera generación, monobactámicos, y algunas variantes llegan a hidrolizar carbapenémicos; este tipo de enzimas han sido reportadas en todas las especies del género *Klebsiella* (Iredell *et al.*, 2016).
- Las  $\beta$ -lactamasas tipo carbapenemasa se han asociado a elementos genéticos móviles. Estas enzimas presentan la capacidad de hidrolizar carbapenémicos y a la mayoría o a todos los antibióticos betalactámicos existentes. Según la clasificación funcional, se encuentran en el grupo 2 y 3 (Bush y Jacoby, 2010). Las carbapenemasas se dividen en tres grupos:
  - Carbapenemasas clase A; son enzimas que contienen una serina en el sitio activo. El primer caso de una cepa de *K. pneumoniae* que expresó una carbapenemasa se identificó en Carolina del Norte en 1996, dando origen a la carbapenemasa conocida como *bla*<sub>KPC</sub>.
  - Metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL): este grupo se caracteriza porque el mecanismo hidrolítico depende de la interacción con iones zinc. Algunas enzimas de este tipo como *bla*<sub>VIM</sub> se encuentran ampliamente distribuidas en *K. pneumoniae*. (Boyle *et al.*, 2010), y otras como *bla*<sub>NDM-1</sub> se describieron por primera vez en esta bacteria.
  - Oxacilinasas: Las oxacilinasas presentan una gran capacidad hidrolítica contra carbapenémicos, pero además afectan oxacilinas. No son inhibidas por ácido clavulánico ni quelantes como EDTA (Laupland *et al.*, 2007) lo que complica su confirmación desde el laboratorio. *bla*<sub>OXA-48</sub> se ha diseminado ampliamente en *K. pneumoniae*.

### 2.3.2. Resistencia a fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas actúan inhibiendo la topoisomerasa II (ADN- girasa) o topoisomerasa IV, enzimas necesarias en los procesos de replicación, recombinación y transcripción del ADN. Las quinolonas deben penetrar a través de la membrana bacteriana y alcanzar su diana celular, para ejercer su efecto citotóxico e inducir la muerte de la célula. Por ello, los mecanismos de resistencia a las fluoroquinolonas se pueden manifestar de forma aislada o en combinación e incluyen:

Modificación del sitio blanco: Constituyen el principal mecanismo de adquisición de resistencia a fluoroquinolonas en enterobacterias. Entre estas se encuentran mutaciones cromosómicas y la captación de genes de transferencia plasmídica. La resistencia codificada en el cromosoma ocurre por mutaciones en la región QRDRs (del inglés “quinolone resistance-determining regions”) de los genes blancos (*gyrA* y *gyrB*, que codifican la subunidad A y B de la ADN girasa, respectivamente y *parC* y *parE* que codifican la subunidad A y B de la topoisomerasa IV, respectivamente) (Cavaco *et al.*, 2009). Por otra parte, la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos es debida a genes *qnr* (*qnrA*, *B* and *S*), los cuales codifican para una proteína denominada Qnr que actúa uniéndose y protegiendo a la girasa y a la topoisomerasa IV de la acción de las quinolonas, estos genes han sido identificados en diferentes especies de enterobacterias, siendo originalmente reportada en un aislamiento clínico de *K. pneumoniae*, en USA en 1998 (Fabrega *et al.*, 2009; García *et al.*, 2018).

Inactivación enzimática: La variante cr de *aac(6')-Ib* codifica una enzima aminoglucósido acetiltransferasa, que confiere sensibilidad reducida a ciprofloxacina por una N-acetilación de sus amino piperacilina (García *et al.*, 2018).

Alteraciones en la permeabilidad y expulsión de antimicrobianos: Este tipo de resistencia se debe a la sobreexpresión de bombas de eflujo o las alteraciones de porinas y a la codificación plasmídica de bombas de expulsión activas QepA y OqxAB que causan un aumento moderado en el nivel de resistencia a norfloxacina y ciprofloxacina, y no afecta de forma significativa al ácido nalidíxico, ni al resto de fluoroquinolonas (Robicsek *et al.*, 2006).

### 2.3.3. Resistencia a aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son antibióticos de estructura heterocíclica, bactericidas de amplio espectro, que actúan sobre las bacterias inhibiendo la correcta síntesis proteica. La resistencia a los aminoglucósidos puede ser debida a tres mecanismos distintos: disminución de la acumulación intracelular, alteraciones de la diana, y a la inactivación enzimática del antibiótico llevada a cabo por enzimas modificadoras de los aminoglucósidos (EMAG).

Las EMAG son el mecanismo más frecuente que confiere resistencia a los aminoglucósidos. La modificación de un aminoglucósido por parte de estas enzimas provoca que su fijación al RNA 16S se vea afectada y de esta forma pierda su actividad. Los genes que las codifican suelen encontrarse en plásmidos y transposones. (Krauze *et al.*, 2016; Grünbaum, 2011). Existen más de 50 tipos diferentes de EMAG, que se pueden agrupar en tres tipos, según la reacción que catalizan:

- N-acetiltransferasas: catalizan una acetilación, transfiriendo un grupo acetato desde la AcetilCoenzima A a un grupo amino del aminoglucósido.
- O-fosfotransferasas: Catalizan una fosforilación, transfiriendo un grupo fosfato desde un ATP a un grupo hidroxilo del aminoglucósido.
- O-nucleotidiltransferasas: Transfieren un nucleótido monofosfato desde un nucleótido trifosfato a un grupo hidroxilo del aminoglucósido.

### 2.3.4. Resistencia en cepas hvKP

La prevalencia de resistencia a los antibióticos en los aislados de hvKP es rara en comparación con la alta prevalencia de los aislados de cKP resistentes a los antibióticos (Paczosa y Mecsas, 2016; Lee *et al.*, 2017). A excepción de la resistencia intrínseca a la ampicilina, la mayoría de las cepas de hvKP rara vez son resistentes a los antibióticos y generalmente son susceptibles a los fármacos antimicrobianos de uso común (Paczosa y Mecsas, 2016). Sin embargo, con la difusión global de elementos genéticos móviles que albergan varios genes de resistencia a los antibióticos, algunos aislados de hvKP resistentes a los antimicrobianos han emergido en los últimos años (Zhang *et al.*, 2016) principalmente en los países con una difusión epidémica de hvKP. Es por esta

razón que el manejo de las infecciones por hvKP resistente a los antimicrobianos se ha hecho más difícil, llegándose a encontrar cepas resistentes a los carbapenémicos. La razón de la baja prevalencia de resistencia a los antibióticos en las cepas de hvKP sigue sin estar clara; sin embargo, la posibilidad de que hvKP adquiera más genes de resistencia a los antibióticos en los próximos años es latente. La confluencia de hipervirulencia y multidrogorresistencia en hvKP tiene el potencial de crear un escenario complicado, que podría aumentar las tasas de morbilidad y mortalidad en gran medida por este tipo de infecciones y las dificultades para manejarlas podrían hacer de esta variedad la próxima "superbacteria" mundial en espera.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Antecedentes generales

A nivel internacional se han reportado múltiples estudios de vigilancia epidemiológica en el género *Klebsiella* que han logrado identificar la prevalencia de los mecanismos de resistencia antimicrobiana, así como dilucidar las características que presentan las cepas en diferentes partes del mundo. En el trabajo realizado por Dortet *et al.* (2017) llevado a cabo en Francia se analizaron las tendencias de la producción de carbapenemasas en enterobacterias, encontrando que la enzima responsable de esta resistencia identificada en un mayor porcentaje fue OXA-48-like (85.6%) en primer lugar, NDM (8.5%) en segundo lugar y VIM (2.7%) en tercero; la especie que más se reportó como productora de carbapenemasa fue *K. pneumoniae* y el género que ocupó el primer lugar en el total de los aislados resistentes a carbapenémicos fue *Klebsiella* spp. seguido de *Enterobacter* spp. Los autores hacen especial énfasis en la implementación de un sistema que permita detectar pacientes en riesgo para identificar a los portadores de enterobacterias productoras de carbapenemasas y para poder implementar medidas de higiene estrictas y un tratamiento específico con antibióticos efectivos para prevenir y controlar los brotes nosocomiales.

En otro estudio realizado por Guo *et al.*, (2017) se analizaron 369 cepas provenientes de infecciones invasivas causadas por *K. pneumoniae* en pacientes de un hospital chino en busca de cepas hipermucoides. El 22.8% (84) de estos aislados dio positivo para el fenotipo hipermucoide y los principales tipos de infecciones invasivas de las que se aislaron fueron: absceso hepático primario con un 44% (37), bacteriemia con 25% (21) e infecciones abdominales con 14.8% (13). El serotipo principal que se encontró fue el de K1 con un 23.8% (20/84) y K2 con un 42.9% (36/84). Se encontraron 4 cepas hipermucoides resistentes a los carbapenémicos y en general los aislados hipermucoides fueron más susceptibles a los agentes antimicrobianos usados clínicamente con frecuencia en comparación con los aislados que no eran hipermucoides. Los genes de virulencia: receptor de aerobactina férrica (*iutA*), proteína de adhesión fimbrial (*mrkD*), sideróforo aerobactina (*aerobactin*), receptor de hierro

transmembranal (*iroN*) y el gen responsable del fenotipo mucoide A (*rmpA*) que están asociados a la hipervirulencia en *K. pneumoniae* fueron identificados principalmente en los aislados hipermucoides y no en las cepas no hipermucoides. ST23 fue la secuencia tipo más prevalente con un 27.1% (19/70), seguido de ST65 con un 25.7% (18/70). La homología de los 84 aislados hipermucoides fue diversa, no teniendo un origen clonal en común. El 95.2% de los aislados hipermucoides de este estudio fueron positivos para el gen *rmpA*, mientras que el 41.1% de los aislados no hipermucoides también fueron positivos para el gen *rmpA*. La importancia de este estudio recae en el hecho de haber sido llevado a cabo en uno de los países en donde se desarrolló un brote epidémico de las cepas hipermucoides, con un amplio número de cepas y con una comparación de cepas hipermucoides con no hipermucoides causantes de infecciones invasivas.

En otro estudio llevado a cabo por Imai *et al.*, (2019) en Japón se compararon las características clínicas de las infecciones del torrente sanguíneo causadas por tres especies del género *Klebsiella* (*K. pneumoniae*, *K. variicola* y *K. quasipneumoniae*). De un total de 119 cepas inicialmente identificadas como *K. pneumoniae* se identificaron 21 (17.7%) como *K. variicola* y 11 (9.2%) como *K. quasipneumoniae* y 87 (73.1%) se mantuvieron como parte de la especie *K. pneumoniae*. Un 21% (25/119) de los aislados fue positivo para el fenotipo hipermucoide, identificando dos en la especie *K. variicola* y uno en la especie *K. quasipneumoniae*. De los 7 genes de virulencia que se buscaron, el gen responsable del fenotipo mucoide A (*rmpA*) y el gen receptor de aerobactina férrica (*iutA*) solo se encontraron en las cepas de *K. pneumoniae*, mientras que los genes: gen participante en la biosíntesis del sideróforo yersiniabactina (*ybtS*), gen participante en la biosíntesis del sideróforo enterobactina (*entB*), gen mediador de la absorción de hierro férrico (*kfu*), gen asociado al metabolismo de la alantoína (*allS*) y el gen de la adhesina fimbrial tipo 3 (*mrkD*) se encontraron en diversas proporciones sin cambios significativos. Se identificaron 3 cepas con el fenotipo BLEE, dos de *K. pneumoniae* y una de la especie *K. variicola*. En este estudio se evidenciaron las características fenotípicas y la prevalencia de genes de virulencia entre las tres especies estudiadas, ya que en muchas ocasiones se

subestima el potencial patogénico de las especies: *K. variicola* y *K. quasipneumoniae*.

En México se han realizado algunos estudios en los últimos años que nos permiten conocer el panorama de las tendencias de resistencia y las características de las infecciones causadas por el género *Klebsiella*. Uno de ellos es el trabajo realizado por Garza-González *et al.* (2019), en el cual se evaluaron las tasas de resistencia a los antimicrobianos en patógenos bacterianos de importancia epidemiológica de 47 hospitales mexicanos. En el estudio se incluyeron un total de 22,943 cepas. Se detectó una resistencia a los carbapenémicos de <3% en las cepas de *E. coli*, del 12.5% en las cepas de *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp. y del 40% en las cepas de *P. aeruginosa*. Los géneros que presentaron la mayor resistencia a múltiples fármacos y en los que se identificó un mayor número de cepas multidrogorresistentes fueron en primer lugar *Acinetobacter* spp. con un 53%, seguido de *Klebsiella* spp. con un 22.6%. Se evidenció que el segundo grupo de patógenos más aislado fue el del género *Klebsiella*, solo por detrás de *Escherichia coli*; con un total de 3,334 cepas. Concluyeron que la resistencia a múltiples fármacos de *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp. y *E. coli*; y la resistencia a carbapenémicos en grupos específicos de enterobacterias merecen especial atención en México para tomar medidas que ayuden a frenar la resistencia antimicrobiana.

En otro estudio llevado a cabo en México, realizado por Garza-Ramos *et al.* (2018), se estudiaron 39 cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de infecciones de la comunidad. 36 aislados correspondieron a la especie *K. pneumoniae*, 1 a la especie *K. variicola*, 1 a la especie *K. quasipneumoniae* y 1 a la especie *K. quasivariicola*. Las cepas fueron resistentes a múltiples fármacos y solo el 10.2% (4) presentó el fenotipo BLEE; identificando en estas mismas cepas la enzima CTXM-15 como la responsable del fenotipo. El pulstipo de la mayoría de los aislamientos de pacientes ambulatorios no estaban relacionados, solamente en los aislados de *K. pneumoniae*, se encontraron 3 grupos clonales, cada grupo relacionado al hospital de donde se aislaron. El 89.7% se identificó como productor de biofilm y el 17.9% presentó fenotipo hipermucoide. El serotipo más prevalente fue el K2 seguido de K4 y K5. Las secuencias tipo identificadas fueron heterogéneas y se encontraron 5 ST nuevas. Entre los genes de virulencia más

encontrados se encuentran *fimH* (gen participante en la regulación de la longitud y la mediación de la adhesión de las fimbrias tipo 1), *entB* (gen participante en la biosíntesis del sideróforo enterobactina), *ureA* (gen que codifica para la subunidad de ureasa gamma) y en solo una cepa hipermucoide se encontró el gen *rmpA* (gen responsable del fenotipo mucoide A). En este estudio se buscó una correlación estadística de los perfiles de resistencia, del fenotipo hipermucoide y de la producción de biofilm; y de los genes de resistencia y virulencia encontrados con respecto a las secuencias tipo y la relación clonal de cuatro especies diferentes del género *Klebsiella*; encontrando características compartidas, pero no una diferencia significativa entre cepas hipervirulentas y no virulentas. Los autores destacan que la característica más importante que comparten las especies del género *Klebsiella* es la facilidad que tienen para causar múltiples infecciones en el ser humano además de obtener genes de resistencia antimicrobiana con mucha facilidad a través de transferencia genética horizontal haciendo uso de integrones, transposones y plásmidos.

### **3.2. Antecedentes específicos**

En el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la comunidad (LMHyC) anteriormente se trabajó con cepas de *K. pneumoniae* causantes de infecciones intrahospitalarias y aisladas de diferentes hospitales mexicanos. En estos estudios se determinaron los genes involucrados en la resistencia a los antimicrobianos, así como el perfil plasmídico y la relación clonal que comparten algunas de estas cepas.

En el estudio realizado por Efraín Ortega Domínguez (2009) como trabajo de maestría en el posgrado en Microbiología del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (CICM) del Instituto de Ciencias (ICUAP) se buscaron cepas de *Klebsiella* spp. productoras de BLEE en aislados de infecciones intrahospitalarias provenientes del Hospital para el Niño Poblano, Hospital 20 de noviembre y del Hospital de la mujer. Se encontró que el 76% de las cepas fueron multidrogorresistentes, el 58.3% fueron productoras de BLEE y la mayoría presenta hasta 3 diferentes genes que codifican para BLEE. Un dato relevante es que las cepas provenientes del Hospital 20 de noviembre presentaron un alto porcentaje de cepas con fenotipo hipermucoide.

En otro estudio realizado por Gabriel Abraham González Jiménez como trabajo de maestría en el posgrado en Microbiología del CICM del ICUAP se identificaron los genes relacionados con la resistencia a los betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos; y se estableció la relación filogenética de cepas de *K. pneumoniae* causantes de sepsis neonatal en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital San Alejandro del IMSS de Puebla. Se detectó un brote en el que se vieron involucradas 24 cepas. En el 100% de las cepas se encontró el gen *oxa1*, en el 97.2% el gen *aac(3)-IIa*, en el 83.3% el gen *aac(6')Ib-cr*, en el 86.1% el gen *qnrB*. Se identificó la secuencia tipo 1398.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es considerada por la OMS como un problema de salud mundial, provocando que los sistemas de salud pública de todo el mundo se vean amenazados por la falta de opciones de tratamiento para muchas infecciones que anteriormente eran tratadas y eliminadas de forma sencilla. Los pacientes que adquieren infecciones causadas por bacterias resistentes a los antimicrobianos se ven directamente afectados debido a la incertidumbre ante el diagnóstico, la elevación de los costos del tratamiento y el aumento en el tiempo de hospitalización, sumado al riesgo para la vida que supone contraer infecciones de este tipo.

El género *Klebsiella* siempre ha estado relacionado a la salud humana y en los últimos años ha tomado un papel principal como causante de IAAS, destacando en nivel de importancia: las cepas clásicas multidrogoresistentes de *K. pneumoniae* (cKP), las cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* (hvKP) y las cepas multidrogoresistentes de *K. oxytoca*, debido al número creciente de infecciones que causan anualmente y a la dificultad que conlleva su tratamiento.

En México, el número de reportes de cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* resistentes a los antimicrobianos y causantes de brotes intrahospitalarios ha ido en aumento, manteniendo una tendencia ascendente desde los últimos 5 años, crecimiento que se ha dado a la par de las tendencias mundiales. Por otra parte, existen pocos reportes en México sobre las cepas hvKP a diferencia de muchos países occidentales en los que comienza a reportarse un alto número de este tipo de cepas, además de ser pocas las investigaciones que han abordado este tema en los centros de investigación del país

## 5. JUSTIFICACION

En México, como es de esperar por las tendencias mundiales, el número de reportes por cepas cKP resistentes a antibióticos ha ido en aumento y por otro lado no existen reportes de cepas hvKP aisladas de infecciones nosocomiales, además, de ser muy pocos los estudios que han abordado este tema en los centros de investigación del país. El presente estudio tuvo como finalidad conocer y caracterizar los mecanismos de resistencia a los antibióticos en cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de diferentes hospitales mexicanos; así como identificar las tendencias de resistencia a los antimicrobianos, ver la relación que comparten diferentes especies del género en cuanto a resistencia, reportar posibles aislamientos de cepas hvKP sensibles o resistentes a los antimicrobianos y aportar información acerca del fenotipo hipermucoide.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar fenotípica y molecularmente la resistencia antimicrobiana en cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de la comunidad y de diferentes hospitales mexicanos.

### 6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Ratificar el género de las cepas de *Klebsiella*.
2. Determinar el fenotipo de resistencia.
3. Determinar el fenotipo BLEE y/o AmpC.
4. Identificar los genes involucrados en la resistencia a betalactámicos.
5. Determinar el perfil plasmídico de algunas cepas de interés.
6. Determinar la relación clonal de algunas cepas de interés.
7. Determinar el fenotipo de hiperviscosidad.
8. Determinar en las cepas con fenotipo de hiperviscosidad el gen *rmpA*.

## **7. MATERIAL Y METODOS**

### **7.1. Hipótesis científica**

La resistencia antimicrobiana en las cepas del género *Klebsiella* aisladas de infecciones nosocomiales y de la comunidad en los Hospitales Mexicanos de este estudio, es más alta que la reportada en estudios de vigilancia epidemiológica realizados en otros hospitales mexicano. Resistencia especialmente hacia cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos, con una ligera tendencia al alta, a los carbapenémicos, siendo mecanismos de resistencia compartidos a través de elementos genéticos móviles en su mayoría. Se encontrarán cepas hipervirulentas e hipermucoides que no sean sensibles a los antimicrobianos.

### **7.2. Diseño del estudio**

Estudio descriptivo observacional, multicéntrico, transversal, ambispectivo. La captura de información se realizará de forma ambielectiva y el tipo de población será heterodémica.

### **7.3. Ubicación Espacio-Temporal**

El estudio se llevará a cabo en el Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla dentro del período de agosto de 2017 a mayo de 2020.

### **7.4. Muestreo**

#### **7.4.1. Definición de la Unidad de Población**

La población fuente de este estudio corresponde a las cepas de *Klebsiella* spp. aisladas y recolectadas de los Hospitales: Hospital General I.S.S.S.T.E. de Puebla, I.S.S.S.T.E.P., Hospital para el Niño Poblano, Hospital General Regional No.72 I.M.S.S y el laboratorio clínico privado “Los Ángeles” de la Ciudad de Puebla; dentro del periodo de enero del 2017 a diciembre del 2019.

#### **7.4.2. Selección de la muestra**

En este trabajo se estudiarán las cepas de *Klebsiella* spp., que cuenten con un informe de resistencia a los antimicrobianos generado por el sistema semiautomatizado Vitek2.

#### **7.4.3. Criterios de selección de las unidades de muestreo**

Criterio de inclusión: Cepas del género *Klebsiella* aisladas de infecciones intrahospitalarias o adquiridas en la comunidad, recuperadas de cualquier tipo de muestra, sin importar el servicio hospitalario, edad o sexo del paciente.

Criterio de exclusión: Cepas causantes de infecciones intrahospitalarias o adquiridas en la comunidad que no pertenecieran al género *Klebsiella*.

Criterios de eliminación: Cepas en las que no se ratificó su pertenencia al género *Klebsiella* o que estaban contaminadas y no se logró separarlas, las cepas que tenían reporte de sensibilidad a los antimicrobianos y las cepas que no contaban con fenotipo hipermucoide.

#### **7.4.4. Diseño y tipo de muestreo**

Se utilizó el tipo de muestreo determinístico por conveniencia del investigador para seleccionar cepas solo dentro del periodo de agosto de 2017 a diciembre de 2019.

#### **7.4.5. Tamaño de la muestra**

El tamaño de la muestra fue conveniente al investigador, para el estudio de las cepas de los hospitales seleccionados en los que se aprobó la colaboración

### **7.5. Definición de las variables y escalas de medición**

Variables independientes: Cepas causantes de infecciones intrahospitalarias y de la comunidad, aisladas de diferentes servicios, en diferentes fechas, de diferentes orígenes de la muestra y de pacientes de sexo y edad indistintos; en las que el informe clínico reporte identificación del género *Klebsiella* spp. y posible resistencia a los antimicrobianos.

Variables dependientes: Resultados de la identificación bioquímica, variaciones en el perfil de resistencia antimicrobiana, en la presencia del fenotipo BLEE, AmpC e hipermucoide, en la presencia de genes y el perfil plasmídico de las cepas de *Klebsiella* spp. causante de infecciones intrahospitalarias y de la comunidad en el periodo de tiempo establecido.

**Tabla 1. Variables de población**

<u>Variable</u>	<u>Tipo</u>	<u>Escala</u>	<u>Unidad de Medición</u>	<u>Equipo</u>
Hospital de aislamiento	Cualitativa	Nominal No binaria	I.S.S.S.T.E., I.S.S.S.T.E.P., I.M.S.S, etc.	Hoja de recolección
Servicio Hospitalario	Cualitativa	Nominal No binaria	UCI, PEDH, UCIN, MIH, CirH, etc.	Hoja de recolección
Fecha de aislamiento	Cuantitativa	Discreta	Día/Mes/Año	Hoja de recolección
Muestra	Cualitativa	Nominal No binaria	Urocultivo, esputo, líquido pleural, etc.	Hoja de recolección
Sexo del paciente	Cualitativa	Nominal Binaria	Femenino/Masculino	Hoja de recolección
Edad del paciente	Cuantitativa	Continua	0-99 años	Hoja de recolección

**Tabla 2. Variables de estudio**

<u>Variable</u>	<u>Tipo</u>	<u>Escala</u>	<u>Unidad de Medición</u>	<u>Equipo</u>
<u>Identificación Bioquímica</u>	<u>Cualitativa</u>	<u>Nominal no Binaria</u>	<u>Género Bacteriano</u>	<u>Hoja de recolección</u>
<u>Fenotipo de Resistencia Antimicrobiana</u>	<u>Cualitativa</u>	<u>Ordinal</u>	<u>Resistente Intermedio Sensible (CLSI,2018)</u>	<u>Hoja de recolección</u>
<u>Fenotipo BLEE y/o AmpC</u>	<u>Cualitativa</u>	<u>Nominal Binaria</u>	<u>SI / NO</u>	<u>Hoja de recolección</u>
<u>Prueba fenotípica de cuerda</u>	<u>Cualitativa</u>	<u>Nominal Binaria</u>	<u>SI / NO</u>	<u>Hoja de recolección</u>
<u>Amplificación de genes de resistencia</u>	<u>Cualitativa</u>	<u>Nominal Binaria</u>	<u>SI / NO</u>	<u>Hoja de recolección</u>
<u>Perfil plasmídico</u>	<u>Cualitativa</u>	<u>Ordinales</u>	<u>Plásmidos parecidos</u>	<u>Hoja de recolección</u>
<u>Relación Clonal</u>	<u>Cuantitativa</u>	<u>Discreta</u>	<u>Coficiente DICE</u>	<u>Computadora</u>

**Tabla 3. Variables confusoras**

<u>Variable</u>	<u>Tipo</u>	<u>Escala</u>	<u>Unidad de Medición</u>	<u>Equipo</u>
<u>Análisis Bioinformático</u>	<u>Cualitativa</u>	<u>Ordinal</u>	<u>Relación filogenética</u>	<u>Computadora</u>

### **7.6. Método de recolección de datos**

La recolección de datos se hará en dos etapas, en la primera se utilizarán fuentes secundarias de información, específicamente los datos proporcionados por los hospitales en el informe clínico y epidemiológico de las cepas; y en la segunda etapa será a partir de fuentes primarias de información como los resultados de los experimentos a realizar. Las dos etapas se utilizará el método de observación de forma sistemática, estructurada y controlada.

### **7.7. Recursos humanos**

- Alumno que realizara la investigación: Marco Arturo Pérez Sánchez.
- Asesor experto: Patricia Lozano Zarain.
- Asesores metodológicos: Margarita M. P. Arenas Hernández y Rosa del Carmen Rocha Gracia.

### **7.8. Recursos materiales**

- Hojas de recopilación de datos (Informa clínico).
- Material bibliográfico recopilado
- Hojas de recolección de datos
- Instalaciones y equipo del laboratorio de microbiología hospitalaria y de la comunidad
- Suministros de microbiología

### **7.9. Recursos financieros**

- Recursos del Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la comunidad del Centro en investigación en Ciencias Microbiológicas del ICUAP. Proyectos VIEP-BUAP

## 7.10. Bioética

No se requirió de consentimiento informado por parte de los pacientes, ya que las cepas fueron aisladas de muestras clínicas tomadas de forma rutinaria y no se trabaja directamente con las muestras. Los datos de los pacientes se mantuvieron en anonimato. Los comités de ética e investigación de los hospitales aprobaron los protocolos para este estudio: Hospital I.S.S.S.T.E (188.2018); I.S.S.S.T.E.P. (004/2015EXT); Hospital para el Niño Poblano (HNP/ENS/177/2016).

## 7.11. Material Biológico

Durante el periodo de agosto de 2017 a enero de 2019 se recolectaron 75 cepas provenientes de diferentes hospitales mexicanos y de un laboratorio privado (Figura 1); dentro de estas 60 cepas provinieron del I.S.S.S.T.E. Hospital Regional Puebla, 3 cepas del Hospital para el niño Poblano, 3 cepas del I.S.S.S.T.E.P., 6 cepas del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla y 3 cepas del Laboratorio Clínico Especializado “Los Ángeles” de la ciudad de Puebla. Todas las cepas llegaron al LMHyC del CICM de la BUAP con datos generales de las cepas y un informe del perfil de resistencia antimicrobiana e identificación del microorganismo obtenido por el sistema semiautomatizado Vitek 2 (bioMérieux, Inc.®).














**Figura 1. Localización de los Hospitales y el laboratorio privado participantes en el estudio.** Un hospital se encuentra en el estado de México y tres hospitales junto con el laboratorio privado se encuentran en el estado de Puebla.



## 7.12. Crioconservación e Identificación Bacteriana

Las cepas se recuperaron del vial de transportación en agar TSA (MCD Lab. ®), posteriormente se sembraron en agar selectivo MaConkey (MCD Lab. ®) para confirmar su pureza y guardarlas en crioconservación a -72°C en crioviales con caldo infusión cerebro-corazón (BHI)/Glicerol al 10%. Se llevaron a cabo pruebas bioquímicas para la identificación del género *Klebsiella* (Tabla 4) y los resultados se compararon con los esquemas de identificación de bacterias de Importancia Clínica de MacFaddin (MacFaddin, 2003).

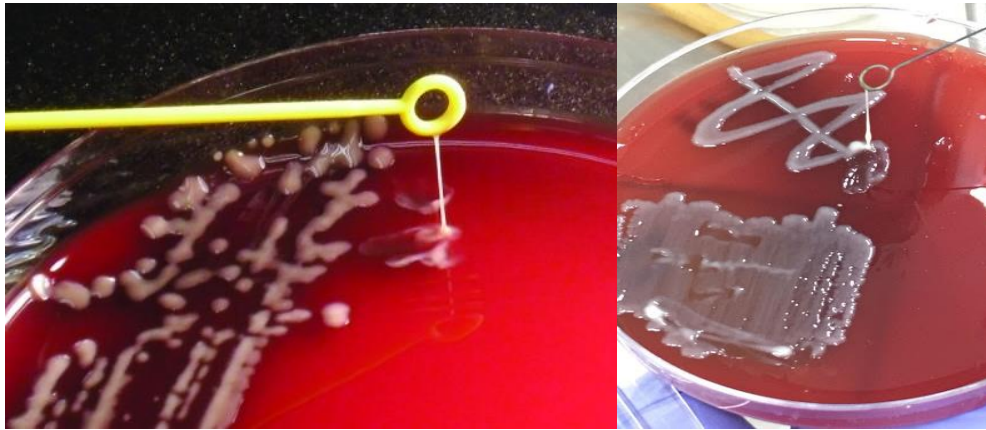
**Tabla 4. Fundamento, características e interpretación de las pruebas bioquímicas utilizadas en el estudio.** Tomado de MacFaddin, 2003.

<u>Medio Utilizado</u>	<u>Medio sin inocular</u>	<u>Fundamento</u>	<u>Interpretación de Resultados en <i>Klebsiella</i> spp.</u>	<u>Medio inoculado con <i>Klebsiella</i> spp.</u>
Triple Sugar Iron Agar (TIA)		Evalúa la fermentación de azúcares y la producción de ácido sulfhídrico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Superficie ácida (amarilla)/Superficie ácida (amarilla): fermentación de los tres azúcares.</li> <li>Producción de gas +.</li> <li>Producción de HS<sub>2</sub> -</li> </ul>	
Lysine Iron Agar (LIA)		Evalúa la descarboxilación y desaminación de la lisina y la producción de ácido sulfhídrico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Descarboxilación de la lisina +</li> <li>Desaminación de la lisina -.</li> <li>Producción de HS<sub>2</sub> -</li> </ul>	
Agar Citrato de Simmons		Evalúa la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Crecimiento satisfactorio.</li> <li>Cambio en el indicador</li> </ul>	
Medio Christensen (Agar Urea Base)		Evalúa la actividad ureásica.	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>K. pneumoniae</i>: Positivo. Crecimiento satisfactorio y vire del indicador.</li> <li><i>K. oxytoca</i>: Negativo. Sin Crecimiento.</li> </ul>	
Medio Movilidad-Indol-Ornitina (MIO)		Evalúa la movilidad, producción de indol y actividad enzimática ornitina descarboxilasa.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Movilidad - . Ornitina -.</li> <li>Producción de indol: <i>K. pneumoniae</i> - . <i>K. oxytoca</i> +.</li> </ul>	
Medio MR-VP		En este medio se lleva a cabo el ensayo de rojo de metilo y Vogues- Proskauer, que evalúan los productos finales del metabolismo de la glucosa.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rojo de Metilo: 70% +</li> <li>Productos ácidos</li> </ul>	
			<ul style="list-style-type: none"> <li>Vogues Proskauer: 85% +</li> <li>Productos neutros</li> </ul>	

## 7.13. Determinación del fenotipo hipermucoide

Se estandarizó la “prueba fenotípica de cuerda” en agar sangre de carnero al 5%. Se sembraron 6 cepas por placa, procurando tener una pequeña parte de

masivo y también colonias aisladas para estirar en ambas partes y poder analizar la formación de una “cuerda” o “hilo” mucoide, siendo positivas en las que se formó con una longitud mayor a 0.5 cm (Figura 2). Se realizó por duplicado en todas las cepas.

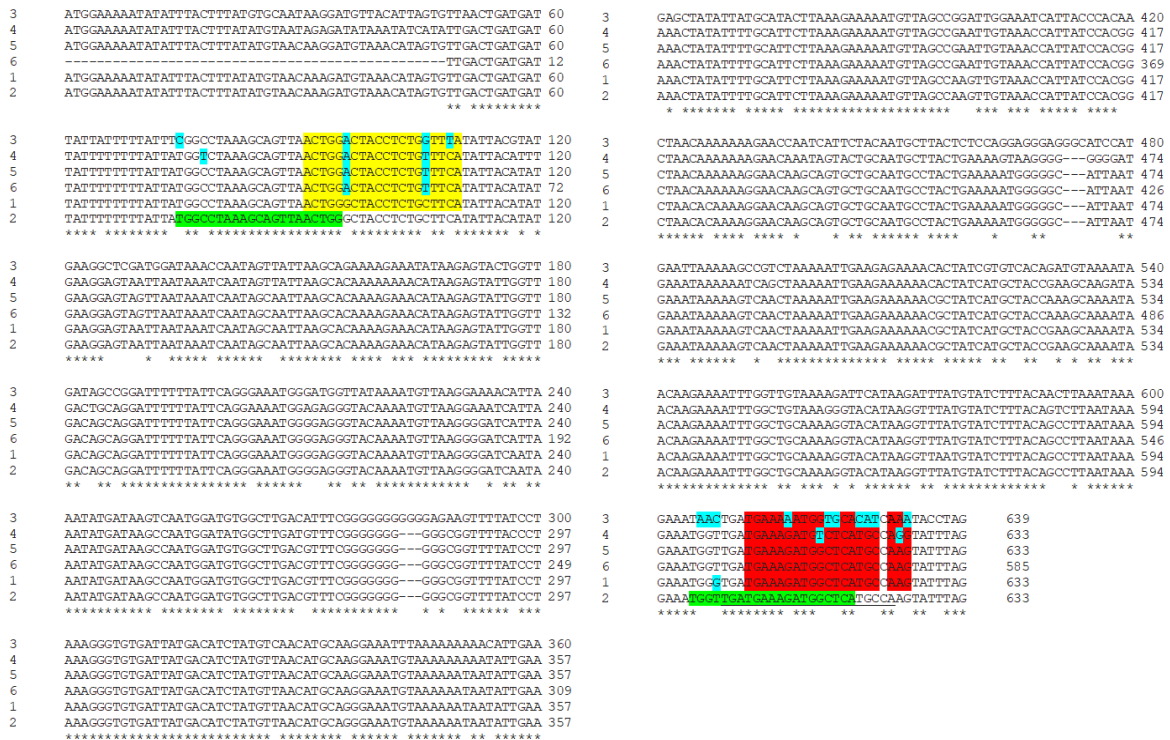


**Figura 2. Ejemplos del fenotipo hipermucoide positivo en cepas de *K. pneumoniae*.** Izquierda: Tomado de Shon *et al.*, 2013. Derecha: Cepa hipermucoide de este estudio.

#### 7.14. Búsqueda del gen *rmpA*

Se buscó por PCR el gen responsable del fenotipo mucoide A (*rmpA*) en las cepas que fueron positivas para el fenotipo hipermucoide. Se comenzó haciendo una búsqueda de los oligonucleótidos reportados en la literatura para la identificación de este gen y un análisis bioinformático de las secuencias reportadas del gen *rmpA* en la base de datos del NCBI. Se identificaron sobre el alineamiento realizado de las secuencias del gen *rmpA* los oligonucleótidos reportados por Yu y colaboradores (2006) (amarillos), que fueron elegidos por amplificar un replicón de mayor tamaño a diferencia de otros reportados en la literatura que amplificaban productos de 230 pb de una región no conservada y por ser los que se han probado y utilizado en la mayoría de estudios en los que se ha buscado este gen, y también se identificaron en el alineamiento otros oligonucleótidos que se propusieron en este estudio (verdes), con base a lo observado en las variantes reportadas (Figura 3). Se analizaron las características de los dos pares de oligonucleótidos con ayuda de los programas OligoCalc (Oligo Calculator version 3.27) y mfold web server para determinar cuáles serían utilizados en este estudio, observando que los oligonucleótidos reportados por Yu y colaboradores eran más estables al presentar menor

probabilidad de generar estructuras secundarias además de tener una Tm cercana en ambos oligos (Tabla 5). Por esta razón se decidió utilizar los oligonucleótidos reportados por Yu y colaboradores y se mandaron a sintetizar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT- UNAM), las condiciones de reacción fueron las mismas que las reportadas por Yu y colaboradores (Tabla 6).



**Figura 3. Alineamiento de nucleótidos de las variantes del gen *rmpA* reportadas en la base de datos del NCBI e identificación de los oligonucleótidos que se evaluaron para ser usados en este estudio.** Amarillo: Forward de los oligos reportados por Yu y colaboradores. Rojo: Reverse de los oligos reportados por Yu y colaboradores. Verde: oligos degenerados propuestos en este estudio. Azul: cambios aminoacídicos en la región de los oligos evaluados. Se decidió proponer unos oligos degenerados por los cambios aminoacídicos observados en la región de unión de los oligos diseñados por Yu y colaboradores.

**Tabla 5. Características de los oligos evaluados en este estudio.** Características analizadas con ayuda de los programas OligoCalc y mfold.

Primers amarillos (Reportados por Yu y colaboradores)								
Secuencia	Reverso Complementario	Tamaño del gen	Tamaño del replicón	Longitud	% GC	Estructuras secundarias	Tm	BLAST
F- 5' <b>ACTGGGCTACCTCTGCTTCA</b> 3'		633 pb	535 pb	20	55 %	2 ↓	60.5	✓
R- 5' <b>CTTGATGAGCCATCTTTCA</b> 3'	<b>TGAAAGATGGCTCATGCAAG</b>			20	45 %	1 ↓	56.4	✓
Primers verdes (Propuestos en este trabajo)								
Secuencia	Reverso Complementario	Tamaño del gen	Tamaño del replicón	Longitud	% GC	Estructuras secundarias	Tm	BLAST
F- 5' <b>GGYC TAAAGCACTTAAC TGG</b> 3'		633 pb	555 pb	21	43-52 %	2 ↓ a 51°	57.5 a 61.2	✓
R- 5' <b>TGRYMCATYTTTCATCAVYYA</b> 3'	<b>TRBFGATGAAARATGKRYCA</b>			21	19-52 %	2 ↓	47.6 a 61.2	✓

**Tabla 6. Condiciones de reacción para la amplificación del gen *rmpA*.** (Yu *et. al.* (2006))

Gen	Primer	Desnaturalización inicial	Número de ciclos	Condiciones		Extensión final	Conservación final	Tamaño esperado	Referencia
<i>rmpA</i>	rmpA-F ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	94°C/ 5 min	35 Ciclos	Desnaturalización	94°C/ 30 seg	72°C/1 min	10°C	535 pb	Yu <i>et.al.</i> (2006)
	rmpA-R CTGCATGAGCCATCTTCA			Alineamiento	60°C/30 seg				
				Extension	72°C/1 min				

### 7.15. Determinación del perfil de resistencia antimicrobiana y Fenotipo AmpC y/o BLEE.

Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en disco Kirby Baüer, probando en total 20 antibióticos de 6 familias diferentes. Se resuspendió en un tubo de ensayo con 3 ml de solución salina isotónica (SSI) al 0.85 % (masa/volumen) de NaCl, colonias aisladas de un cultivo puro de 24 horas sembrado en agar TSA (MCD Lab®), hasta ajustarlo a una turbidez de 0.5 en la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). Se inocularon 4 placas de agar Mueller- Hinton (MCD Lab®) por cepa, con un hisopo estéril impregnado con la suspensión ajustada, deslizándolo por toda la placa en forma de masivo de arriba abajo, tres veces y girando la placa 45° en cada cambio y pasándolo por último sobre la periferia de la placa para conseguir un crecimiento uniforme. Posteriormente, con la ayuda de unas pinzas, se colocaron los 20 discos de antimicrobianos (BBL™) con una distribución específica (Figura 4 Panel B, C y D) para no generar efectos antagónicos o sinérgicos entre los antimicrobianos. Finalmente, se midieron los halos de inhibición y los resultados se interpretaron de acuerdo a los valores establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2018) (Tabla 7). *K. pneumoniae* ATCC 7603 fue usada como control.

#### 7.15.1. Fenotipo AmpC y/o BLEE

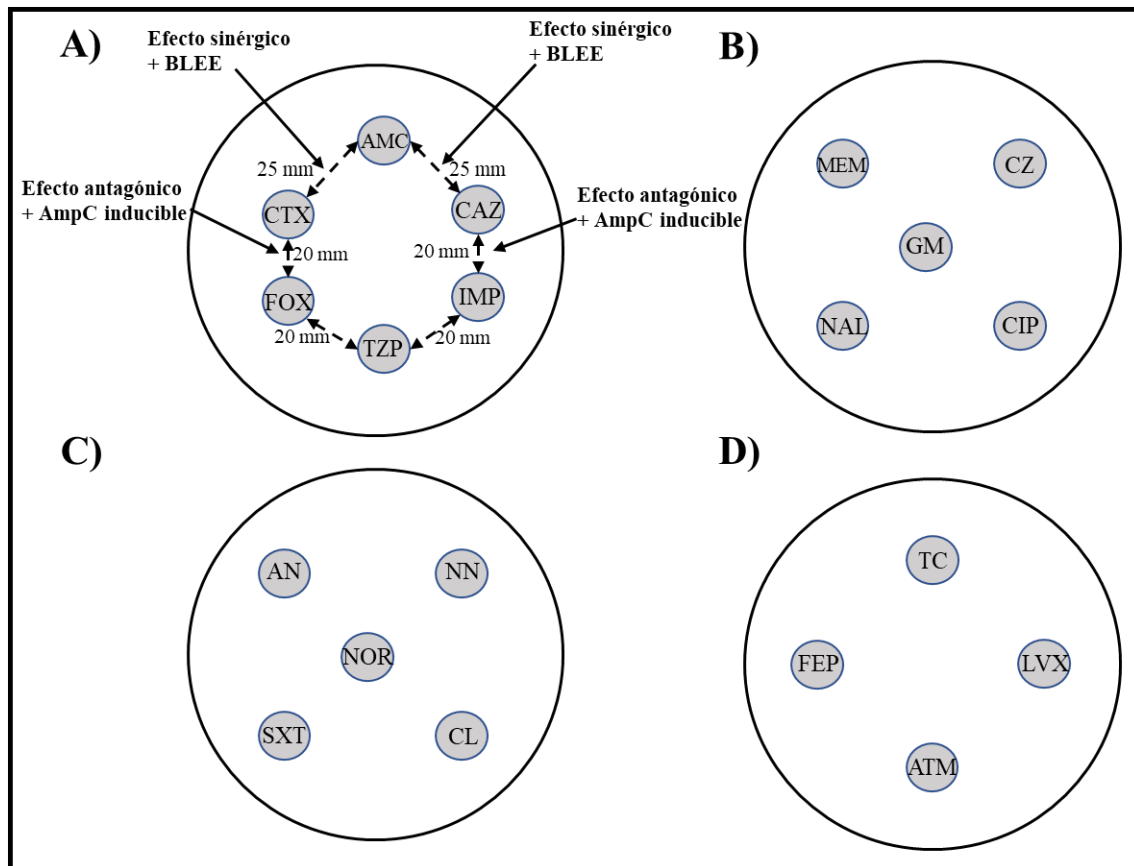
Se llevó a cabo el mismo procedimiento de la técnica de difusión en disco Kirby-Baüer para esta prueba. Se destinó una placa para evaluar estos fenotipos en los que se colocaron 6 discos de antimicrobianos: en la parte superior se colocó un disco de amoxicilina con ácido clavulánico (20-10 µm) y uno de cefotaxima (30 µg) y ceftazidima (30 µg) a sus extremos hacia abajo a una distancia de 25mm; en los que la aparición de un efecto sinérgico entre los antibióticos betalactámicos y el disco que contiene al inhibidor de betalactamasas (ácido

clavulánico) fue considerado como un resultado positivo para el fenotipo BLEE. Debajo del disco de cefotaxima (30 µg) se colocó uno de cefoxitina (30 µg) y debajo del disco de ceftazidima (30 µg) uno de imipenem (10 µg), ambos a una distancia de 20mm y en la parte inferior a una distancia de 20 mm de estos dos últimos antimicrobianos un disco de piperacilina tazobactam (100/10 µg), en los que la aparición de un efecto antagónico entre ellos fue considerado como un resultado positivo para el fenotipo AmpC inducible (Figura 4, Panel A).

**Tabla 7. Antibióticos y valores de referencia utilizados para la interpretación de los antibiogramas.**

Grupo o familia	Antibiótico y concentración	Siglas	Interpretación de la medida del halo (mm)		
			sensible	Intermedio	resistente
<b>Inhibidores de la betalactamasa</b>	Amoxicilina-clavulánico 20/10 µg	AMC	≥18	14–17	≤13
	Piperacilina-tazobactam 100/10 µg	TZP	≥21	18–20	≤17
<b>Cefalosporinas</b>	Cefazolina 30 µg	CZ	≥23	20–22	≤19
	Cefoxitina 30µg	FOX	≥18	15–17	≤14
	Cefotaxima 30 µg	CTX	≥26	23–25	≤22
	Ceftazidima 30µg	CAZ	≥ 21	18–20	≤17
	Cefepime 30 µg	FEP	≥ 25	19–24	≤ 18
<b>Monobactámicos</b>	Aztreonam 30 µg	ATM	≥ 21	18–20	≤ 17
<b>Carbapenémicos</b>	Meropenem 10 µg	MEM	≥ 23	20–22	≤ 19
	Imipenem 10 µg	IPM	≥23	20–22	≤ 19
<b>Tetraciclinas</b>	Tetraciclina 30µg	TC	≥ 15	12-14	≤11
<b>Aminoglucósidos</b>	Amicacina 30µg	AN	≥17	15-16	≤14
	Gentamicina 10 µg	GM	≥15	13-14	≤12
	Trobamicina 10 µg	NN	≥15	13-14	≤12
<b>Quinolonas</b>	Ciprofloxacino 5 µg	CIP	≥21	16-20	≤15
	Levofloxacina 5 µg	LVX	≥17	14-16	≤13
	Norfloxacino 10µg	NOR	≥17	13-16	≤12
	Ácido nalidixico 30µg	NAL	≥19	14-18	≤13
<b>Fenicoles</b>	Cloranfenicol 30 µg	CL	≥18	13-17	≤12
<b>Inhibidores de la vía del folato</b>	Trimetoprima-sulfametoxazol 1.25/ 23.75 µg	SXT	≥ 16	11–15	≤10

Tomado de CLSI, 2018.



**Figura 4. Distribución de los discos de antibióticos utilizada para la determinación del fenotipo BLEE y/o AmpC y el perfil de resistencia antimicrobiana.**

Abreviaciones: A) AMC: Amoxicilina con ácido clavulánico, CAZ: Ceftazidima, IMP: Imipenem, TZP: Piperacilina con tazobactam, FOX: Cefoxitina, CTX: Cefotaxima. BLEE: Betalactamasa de espectro extendido, AmpC: Enzima tipo AmpC. B) MEM: Meropenem, CZ: Cefazolina, GM: Gentamicina, NAL: Ácido nalidíxico, CIP: Ciprofloxacino. C) AN: Amikacina, NN: Trobamicina, NOR: Norfloxacino, SXT: Trimetoprima con sulfametoxazol, CL: Cloranfenicol. D) TC: Tetraciclina, FEP: Cefepime, LVX: Levofloxacino, ATM: Aztreonam. ,

### 7.16. Identificación de cepas Multidrogo-resistentes, Extremodrogo-resistentes y Pandrogo-resistentes.

Con base a los resultados de la determinación del perfil de resistencia antimicrobiana, se llevó a cabo la identificación de cepas multidrogo-resistentes (MDR), extremodrogo-resistentes (XDR) y pandrogo-resistentes (PDR) conforme a la clasificación jerárquica propuesta por la Administración Norteamericana de Drogas y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés), el CLSI y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST por sus siglas en inglés) (Magiorakos *et. al.*, 2011) que definen a estos tres niveles de la siguiente manera:

- MDR. - Resistente al menos a un agente en 3 o más categorías de antibióticos que se hayan ensayado.
- XDR. - Resistencia al menos a un agente de cada categoría probada, pero, sensible a  $\geq 2$  categorías de antibióticos que se hayan ensayado.
- PDR. - Resistencia a todos los agentes de todas las categorías de antibióticos que se hayan ensayado.

### **7.17. Identificación de genes de resistencia**

Se realizó lisis bacteriana por choque térmico con la cual se obtuvo el templado de ADN de todas las cepas en estudio para que con base en los resultados de los antibiogramas se realizaran ensayos de PCR para identificar genes que confieren resistencia a los betalactámicos. Se purificaron los productos de PCR de algunas cepas de interés por método de extracción de banda y posteriormente se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT- UNAM). A las secuencias obtenidas se les realizó un análisis bioinformático y en algunas cepas se llevó a cabo “primer walking” para complementar el conocimiento acerca del entorno genético de los genes de resistencia secuenciados. Los pasos detallados de este apartado se explican a continuación:

#### **7.17.1. Obtención de ADN Bacteriano**

Se extrajo el templado de ADN por el método de lisis bacteriana por choque térmico. De un cultivo inicial puro de 24 horas sembrado en agar TSA (MCD Lab®) en forma masiva, se tomó una cuarta parte del total de la superficie de la placa y se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 ml en el que posteriormente se homogeneizó con 800  $\mu$ l de SSI con lo que se lavó el paquete celular y se eliminó el exceso de polisacárido, posteriormente se centrifugó a 13 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos, pasado el tiempo de centrifugación se eliminó la parte acuosa y el paquete celular se le repitieron dos lavados más. Después de los tres lavados se le agregó 800  $\mu$ l de agua inyectable (PISA®), se homogeneizó y se hirvió durante 10 minutos. Finalmente se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos, la parte acuosa que contiene el ADN bacteriano se transfirió a otro tubo y el paquete celular se desechó. Se midió la concentración

y la pureza del ADN Bacteriano con el equipo Nanodrop 2000c (Thermo Scientific®) y se ajustó la concentración a 200 ng/µl.

### 7.17.2. Amplificación de genes de resistencia por PCR

Se seleccionaron oligonucleótidos específicos para amplificar genes de resistencia a los betalactámicos mediante la técnica de PCR. Se buscaron en todas las cepas del estudio los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> que codifican para enzimas BLEE. En las cepas que resultaron resistentes a carbapenémicos se buscaron los genes *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>KPC</sub> que codifican para carbapenemasas (Tabla 8). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador T Professional TRIO Thermocycler (Biometra) con las cantidades de reactivos de reacción estandarizadas (Tabla 9). Se usaron como controles las cepas de *E. coli* C4430 (*bla*<sub>CTX-M</sub> y *bla*<sub>TEM</sub>) de *K. pneumoniae* Kp003 (*bla*<sub>SHV</sub>), de *P. aeruginosa* PE52 (*bla*<sub>IMP</sub>) y VIM-2 (*bla*<sub>VIM</sub>), de *A. baumannii* AN54 (*bla*<sub>NDM</sub>) cepas en las que se identificaron estos genes por secuenciación.

**Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados, condiciones de reacción de PCR y tamaño de amplicones esperados de cada reacción de genes de betalactamasas.**

Gen	Primer	Desnaturalización Inicial	Numero de Ciclos	Condiciones		Extensión final	Conservación final	Tamaño Esperado	Referencia
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	NDMv-F AATATTATGCACCCGGTCGCG	94°/5min	30 Ciclos	Desnaturalización	94°C/1 min	72°C/10min	10°C ∞	732 pb	López et. al 2012
	Alineamiento			54°C/1 min					
	Extensión			72°C/1 min					
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> -F1 ATGTCACTGTATCGCGCTCT	94°/5min	30 Ciclos	Desnaturalización	94°C/1min	72°C/5min	10°C ∞	882 pb	Akpaka P, et al., 1998
	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> -R2 TTACTGCCCGTTGACGCCCA			Alineamiento	55°C/1 min				
	Extensión			72°C/1 min					
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Vimd1-F GATGGYGTGGTCGCATATC	94°/5min	30 Ciclos	Desnaturalización	94°C/1 min	72°C/10min	10°C ∞	600 pb	López et. al 2012
	Vimd3-R CAACRTTMGYTGTGTGYTKGA			Alineamiento	50°C/1 min				
	Extensión			72°C/1 min					
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	IMPd-F CTRCCGCAGWAGMGKCTTTG	94°/5min	30 Ciclos	Desnaturalización	94°C/1 min	72°C/10min	10°C ∞	515 pb	López et. al 2012
	IMPd-R2 GCCADGCTACDANATTGCGTC			Alineamiento	56°C/1 min				
	Extensión			72°C/1 min					
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM1F AGAGTATGAGTATTCAACATT	95°/3m	35 Ciclos	Desnaturalización	95°C/1min	72°C/10min	10°C ∞	837 pb	Hansen et al., 2004
	TEM2R ATCTCAGCATCTGTCTAT			Alineamiento	45°C/1min				
	Extensión			72°C/1min					
<i>bla</i> <sub>CTXM</sub> -Universal	CTXM-Universal F CGATGTGCAGTACCGTAA	94°/5 min	35 Ciclos	Desnaturalización	94°C/30seg	72°C/5min	10°C ∞	566 pb	Batchelor, et. al., 2005
	CTXM-Universal R TTAGTGACCAGAATCAGCGG			Alineamiento	52°C/30seg				
	Extensión			72°C/1min					
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV-1F GGGTTATTCTATTGTGCGT	96°/15seg	24 Ciclos	Desnaturalización	96°C/15seg	72°C/3min	10°C ∞	883/930 pb	Mercier y Levesque, 1990
	SHV-2R TAGCGTTGCCAGTGCTCG			Alineamiento	52°C/15seg				
	Extensión			72°C/2min					

**Tabla 9. Cantidades de los reactivos utilizados en cada PCR 1X.**

Componente	Concentración stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Agua estéril	---	6.12 µl	---
Buffer de reacción NH <sub>4</sub> (Invitrogen®)	10 X	1 µl	1 X
MgCL <sub>2</sub> (Thermo Scientific®)	25 mM	1 µl	2.5 mM
dNTPs Mix (Sigma Aldrich®)	2.5 mM	0.2 µl	0.05 mM
Oligonucleotido "Forward"	25 µM	0.3 µl	0.75 µM
Oligonucleotido "Reverse"	25 µM	0.3 µl	0.75 µM
Taq DNA Polimerasa (Invitrogen®)	5 U/µl	0.08 µl	0.4 U/µl
Muestra de ADN	200 ng/µl	1 µl	20 ng/µl
TOTAL		10 µl	

### 7.17.3. Purificación y Secuenciación de los productos de PCR

Algunos productos de PCR fueron de especial interés debido a los genes identificados y su especie o lugar de procedencia, por lo que se purificaron mediante el método de extracción de banda con ayuda del kit "zymoclean gel DNA Recovery kit" para mandarlos a secuenciar. Se cortó la banda de interés visualizándola con ayuda de un transiluminador, la banda se depositó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, al que se le adicionó *ADB Buffer* hasta cubrir todo el pedazo de banda cortada. El tubo se incubó a 55° C durante 10 minutos y el producto se transfirió a un filtro con tubo colector que se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 minuto, posteriormente el líquido del tubo colector se desechó y se lavó 2 veces con 200 µl de *DNA Wash Buffer* y se centrifugó a 13 000 rpm durante 30 segundos entre cada lavado. El filtro se transfirió a un tubo nuevo y el ADN se eluyó con 20 µl de agua centrifugando a 13 000 rpm durante 1 minuto. Finalmente se midió la concentración de ADN en el NanoDrop siendo  $\geq 25$  ng/µl una concentración óptima y posteriormente se corrió 1 µl del purificado en un gel de agarosa para visualizar el producto. Los purificados se resguardaron a -4°C hasta su envío a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT- UNAM) para ser secuenciados y corroborar la participación de genes de resistencia antimicrobiana a betalactámicos y para determinar su variante alélica.

#### 7.17.4. Análisis Bioinformático de secuencias

Se llevó a cabo el análisis bioinformático de los resultados de secuenciación con ayuda de diferentes softwares, entre los que se encuentran: **1.** Visualización de secuencias: Finch TV, **2.** Formateo de secuencias: Nucleic Acid Sequence “Massager”, **3.** Análisis de secuencias: BLAST- GenBank, **4.** Alineamiento de secuencias: Clustal Omega, **5.** Traducción Aminoacídica: Translate tool- Expasy.

#### 7.17.5. Primer walking

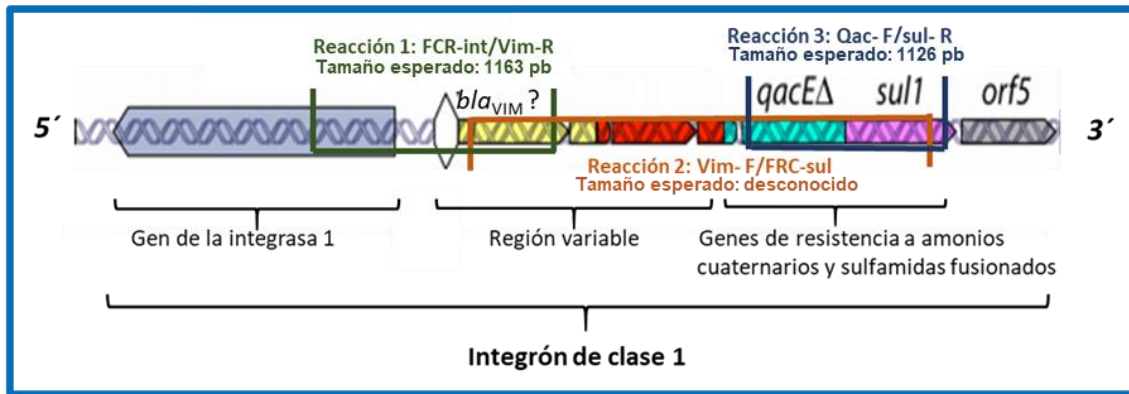
Se llevó a cabo esta estrategia para determinar si los genes que se secuenciaron como responsables de la resistencia a carbapenémicos en dos cepas, estaban asociados a integrones. Se inició, buscando genes específicos de integrones como *int1*, *qacEΔ1* y *sul1* (Tabla 10); y después se combinaron diferentes oligonucleótidos para determinar si contaban con una estructura conservada de un integrón de clase 1 (Figura 5) y para amplificar parte de su región variable (Tabla 11). Los amplificadores no se mandaron a secuenciar, se analizaron los tamaños de los productos de amplificación y se hizo un análisis comparativo con secuencias reportadas en Gen Bank e Integrall.

**Tabla 10. Oligonucleótidos y condiciones de las reacciones de PCR de los genes amplificados para la búsqueda de integrones en las cepas KpE37 y KpS1, resistentes a carbapenémicos.**

Gen	Primer	Desnaturalización inicial	Número de ciclos	Ciclos		Extensión final	Conservación final	Tamaño esperado	Referencia
<i>qacEΔ1</i>	Qac-F GGCTGGCTTTTCTTGITATCG	94°/5min	30 Ciclos	Desnaturalización	94°C/30 seg	72°C/8min	10°C ∞	247 pb	Mazel et al., 2004
	Qac-R TGAGCCCCATACCTACAAAGC			Alineamiento	60°C/30 seg				
	Extensión			72°C/1 min					
<i>int1</i>	Int-F ACGAGCGCAAGGTTTCGGT	94°/5min	30 Ciclos	Desnaturalización	94°C/30 seg	72°C/7min	10°C ∞	465 pb	Jianyu et al., 2005
	Int-R GAAAGGTCTCGGCATACATG			Alineamiento	52°C/30 seg				
	Extensión			72°C/1 min					
<i>sul1</i>	Sul-F TGGTGACGGTGTTCGGCATT	94°/5min	30 Ciclos	Desnaturalización	94°C/30 seg	72°C/8min	10°C ∞	790 pb	Mazel et al., 2004
	Sul-R GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG			Alineamiento	63°C/30 seg				
	Extensión			72°C/1 min					

**Tabla 11. Oligonucleótidos que se utilizaron para la estrategia “primer walking” y condiciones a las que se corrieron las reacciones de PCR.**

Primer	Desnaturalización inicial	Número de ciclos	Ciclos		Extensión final	Conservación final	Referencia
Qac-F GGCTGGCTTTTCTTGITATCG	94°/5min	30 Ciclos	Desnaturalización	94°C/1 min	72°C/10 min	10°C ∞	Mazel et al., 2004
Sul-R GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG			Alineamiento	55°C/1 min			
Extensión			72°C/1 min	Mazel et al., 2004			
FCRint ACCGAAACCTTGGCCTCGT	94°/5min	30 Ciclos	Desnaturalización	94°C/1 min	72°C/10min	10°C ∞	Ayala, 2013
Vim-R CAACRTTIMGYTGTGYTKGA			Alineamiento	55°C/1 min			López et. al 2012
Extensión			72°C/1 min				
Vim-F GATGGYGTITGGTCGCATATC	94°/5min	30 Ciclos	Desnaturalización	94°C/1 min	72°C/10min	10°C ∞	López et. al 2012
FRCsul GAATGCCGAACACCGTCACCA			Alineamiento	55°C/1 min			
Extensión			72°C/1 min	Ayala, 2013			



**Figura 5. Estructura de conservada de un integrón de clase 1 y esquematización de las regiones que se pretendieron amplificar con la estrategia primer walking.** Reacción 1 (verde): Se realizó para analizar si el gen *bla<sub>VIM</sub>* era el primer gen dentro de la región variable. Reacción 2 (naranja): Se realizó para conocer el tamaño aproximado de la región variable. Reacción 3 (azul): Se realizó para analizar si el gen *qacEΔ1* y *sul1* se encontraban fusionados. Los tamaños arrojados por las PCR fueron comparados con secuencias ya reportadas de integrones de clase 1 que contienen al gen *bla<sub>VIM</sub>* con métodos bioinformáticos.

### 7.18. Perfil plasmídico

El perfil plasmídico de las cepas del Hospital General No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla se determinó, mediante lisis alcalina por el método de Kieser (Kieser, 1984). La bacteria se recolectó de un cultivo puro en forma de masivo de 24 hrs, sembrado en una placa de agar BHI al 2% y se llevaron a cabo tres lavados con SSI; posteriormente, al paquete celular se le adicionó 400 µl de solución 1 (Sacarosa 0.3 M, Tris-HCl 25 mM pH=8, EDTA 25 mM pH=8) y se resuspendió con una pipeta. Después, se le adicionaron 100 µl de lisozima (10 mg/ml) y se invirtió el tubo suavemente. Esta mezcla se incubó a 4°C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se le adicionaron 250 µl de solución 2 (NaOH 5 M, SDS 10%), se homogeneizó y se incubó a 54°C durante 30 minutos. Se agregaron 80 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogeneizó con vórtex hasta que tornó una coloración blanca uniforme. Después, se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C durante 20 minutos y del sobrenadante se recuperaron 400 µl. De los 400 µl se tomaron 8 µl para cargarlos en un gel de agarosa al 0.8% y se corrió una electroforesis, durante 1 hora y media a 100 volts con buffer TAE 1X.

### 7.19. Relación Clonal

Se determinó la relación clonal por Electroforesis en Gel de Campos Pulsados con la enzima *Xba1* (PFGE-*Xba1*) en las cepas del Hospital General No. 72

I.M.S.S. Tlalnepantla para determinar su relación clonal ya que este grupo de cepas pudo haber estado implicado en un brote nosocomial. Esta metodología se llevó a cabo de la siguiente forma:

#### **7.19.1. Preparación de insertos**

Se recolectó en tubo eppendorf suficiente bacteria de un cultivo puro sembrado en forma de masivo en placa de agar BHI incubado durante 24 horas a 37°C, se le realizaron tres lavados con SSI. Posteriormente se suspendió una alícuota del paquete celular en 1ml buffer SE (75 mM NaCl- 25 mM EDTA pH:8) y se ajustó la turbidez al patrón No. 4 de la escala de MacFarland ( $12 \times 10^8$  UFC/ml). Se preparó agarosa (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad®) al 1.5% en tampón TE (10mM Tris y 1mM EDTA) y se mantuvo a 54°C. Se mezclaron 0.5 ml de la suspensión bacteriana con 0.5 ml de agarosa y se distribuyó en moldes (insertos). Se dejó solidificar unos minutos en refrigeración.

#### **7.19.2. Lisis Bacteriana**

Se emplearon 3 insertos por cepa, a los que se le añadieron 1ml de Buffer de lisis [50 mM Tris; 50 mM EDTA pH 8; 1% sarcosil; 0.3 mg/ml proteinasa K (Thermo Fisher Scientific®)] y se dejó incubar durante 18 horas en baño María a 54°C.

#### **7.19.3. Lavado de los Insertos**

Se eliminó el buffer de lisis y se llevaron a cabo los siguientes lavados:

- ❖ 3 lavados con agua destilada estéril 10min/54°C
- ❖ 2 lavados con buffer TE 10min/54°C
- ❖ 1 lavado con buffer TE 10min/temperatura ambiente.

Los insertos se conservaron en 1ml de buffer TE a -4°C hasta su utilización.

#### **7.19.4. Digestión Enzimática**

Se utilizó una cuarta parte de inserto por cada cepa de estudio. El volumen final del buffer de digestión fue de 200 µl, agregando: 179 µl de agua destilada estéril, 20 µl del buffer de la enzima y 1ml de la enzima Xba1, se mezcló y se incubó por 14 horas a 37°C.

#### **7.19.5. Preparación del gel de agarosa**

Se preparó agarosa de bajo punto de fusión al 1% en TBE 0.5X, se vertió sobre el molde y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se rellenaron los pozos con el cuarto de inserto y se selló con agarosa que se mantuvo a 50°C.

#### **7.19.6. Electroforesis**

La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de campos pulsados CHEF-DR II (BioRad) con 3L de TBE 0.5X suplementado con tiourea 75µM. El gradiente de voltaje fue de 6 V/cm, y se empleó una rampa lineal pulsada de 1 a 30 segundos durante 23 horas a 14 °C.

#### **7.19.7. Tinción de gel y visualización**

Se tiñó el gel en una solución acuosa de bromuro de etidio (10 µl/ 200 ml) durante 1 min, posteriormente se destiñó en agua destilada por 10 minutos. Se visualizó el gel en un transiluminador ultravioleta MiniBIS Pro-DNR Bio-Imaging Systems. El gel se destiñó en agua destilada, fotografiándose cada 30 minutos hasta la adecuada visualización de las bandas.

## 8. RESULTADOS

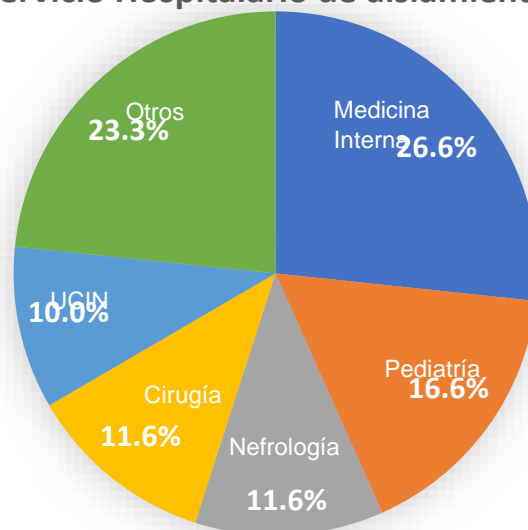
Se trabajo con 75 cepas; 60 cepas provenientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E., Puebla, 3 cepas del Hospital para el niño Poblano, 3 cepas del Hospital I.S.S.S.T.E.P., 6 cepas del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla y 3 cepas del Laboratorio Clínico Especializado “Los Ángeles” de la Ciudad de Puebla.

Los resultados serán abordados de forma individual para cada hospital.

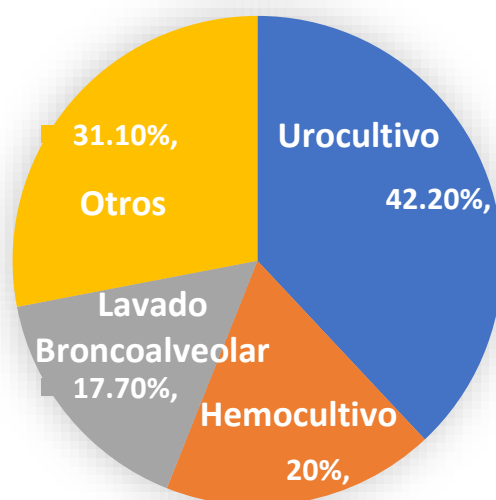
### 8.1. Cepas aisladas de pacientes del Hospital Regional I.S.S.S.T.E Puebla

Las 60 cepas provenientes de este hospital se recuperaron de 48 pacientes en los que se aislaron una o hasta cuatro cepas, debido a que en algunos se tomaron muestras de diferentes sitios anatómicos o en diferente fecha, 25 pacientes fueron del sexo Femenino y 23 del sexo Masculino; todos en un rango de edad de 0 a 79 años; de estas cepas el 93.3 % (56) fueron identificadas como *K. pneumoniae* y el 6.6% (4) como *K. oxytoca* (Anexo 1). Los servicios hospitalarios que predominaron como lugar de aislamiento, fueron: en primer lugar, Medicina Interna, en segundo Pediatría, en tercero Nefrología, en cuarto Cirugía y en quinto la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal (UCIN) (Grafica 1). Solo en 45 cepas se especificó el origen de la muestra, siendo principalmente aisladas de Urocultivo, Hemocultivo y Lavado Bronco-alveolar (Gráfica 2).

Servicio Hospitalario de aislamiento



Grafica 1. Principales servicios hospitalarios de aislamiento de las cepas de *Klebsiella* spp. aisladas del hospital I.S.S.S.T.E. (n=60)

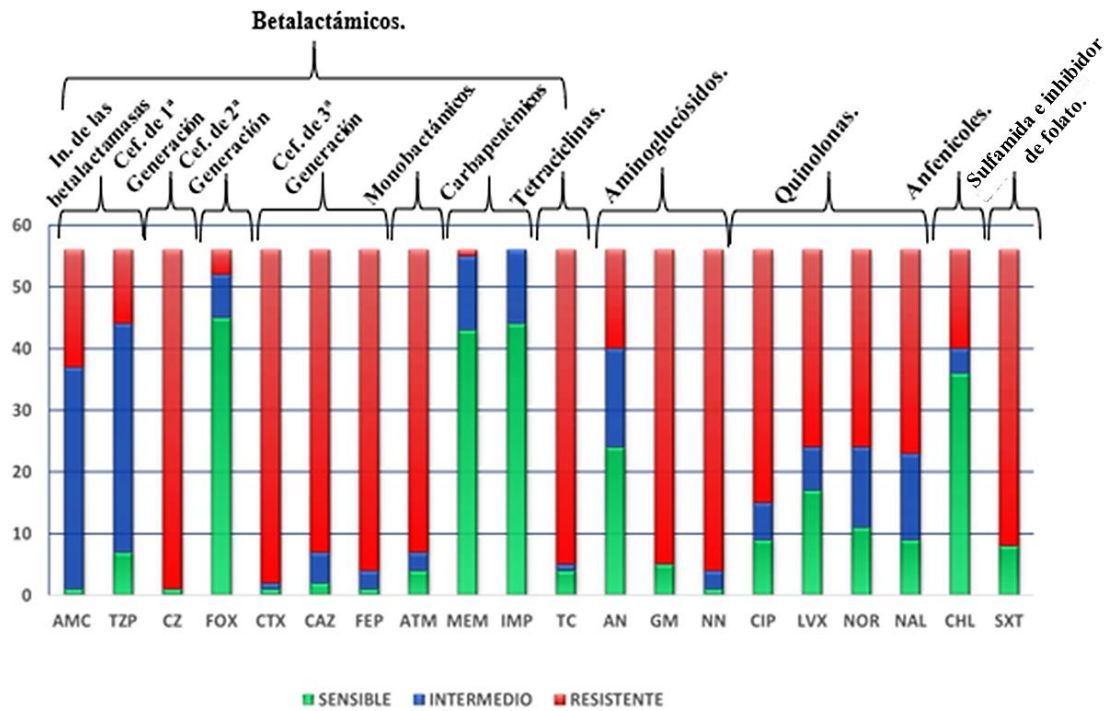


Gráfica 2. Sitio anatómico de aislamiento de las cepas de *Klebsiella* spp. del Hospital regional del I.S.S.S.T.E. (n=60)

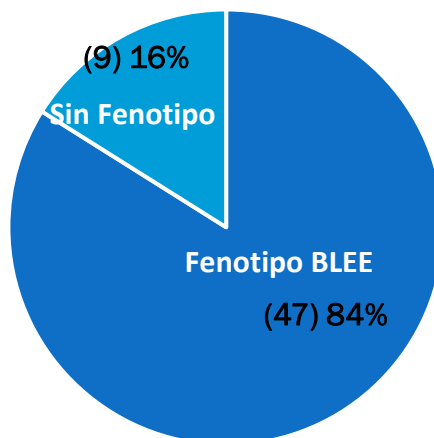
### 8.1.1. Perfil de sensibilidad.

El perfil de sensibilidad antimicrobiana de las 56 cepas de *K. pneumoniae* aisladas del Hospital I.S.S.S.T.E de Puebla mostró que el 96.4% (54/56) fueron cepas multidrogorresistentes. El 98.2% (55/56) de las cepas fue resistente a los betalactámicos, predominando dentro de este grupo la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, en el que se encuentra el antibiótico cefotaxima, a la que fue resistente un 96.4% de las cepas (54/56). Caso contrario se observó en las cefalosporinas de segunda generación, grupo en el que se encuentra el antibiótico ceftaxima, y en los inhibidores de las betalactamasas, en el que se encuentra amoxicilina con ácido clavulánico, en los que se observó una resistencia del 7.1% (4/56) y del 33.9% (19/56) respectivamente. El 92.8% (52/56) fue resistente a los aminoglucósidos, especialmente a la gentamicina a la que el 91% (51/56) de las cepas presentaron resistencia, a diferencia de la amikacina, en donde solo el 28.5% (16/56) fue resistente. El 73.2% (41/56) de las cepas fue resistente a las quinolonas, principalmente a ciprofloxacino. El 91% (51/56) de las cepas fue resistente a las tetraciclinas, el 85.7% (48/56) a sulfonamidas y el 28.5% (16/56) a los anfenicoles. Las cepas fueron resistentes a cefazolina [98.4% (55/56)], cefotaxima [98.4% (55/56)] y cefepime [94.6% (53/56)]; estos son los 3 antibióticos en los que hubo mayor resistencia, meropenem [1.7% (1/56)] y ceftaxima [7.14% (4/56)] son los 2 antibióticos en los que hubo menor resistencia (Gráfica 3). La cepa KpE8 fue la que presentó mayor

resistencia a los 20 antibióticos probados, siendo resistente a todos a excepción de imipenem en el que tuvo un fenotipo intermedio (Tabla 7, fila 12). El fenotipo BLEE se observó en el 83.9% (47/56) de las cepas de *K. pneumoniae*, mientras que el fenotipo AmpC no se observó en ninguna cepa (Grafica 4, Figura 6).



**Gráfica 3. Perfil de resistencia de las cepas de *K. pneumoniae* del Hospital Regional I.S.S.S.T.E para cada uno de los 20 antibióticos probados en el estudio. (n=56)** AMC: ácido clavulánico, TZP: Piperacilina con tazobactam, CZ: Cefazolina, FOX: Cefoxitina, CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, MEM: Meropenem, IMP: Imipenem, TC: Tetraciclina, AN: Amikacina, GM: Gentamicina, NN: Trobamicina, CIP: Ciprofloxacino, LVX: Levofloxacino, NOR: Norfloxacino, NAL: Ácido nalidíxico, CL: Cloranfenicol, SXT: Trimetoprima con sulfametoxazo.



**Grafica 4. Fenotipos observados en las cepas de *K. pneumoniae* del hospital I.S.S.S.T.E. n=56.**

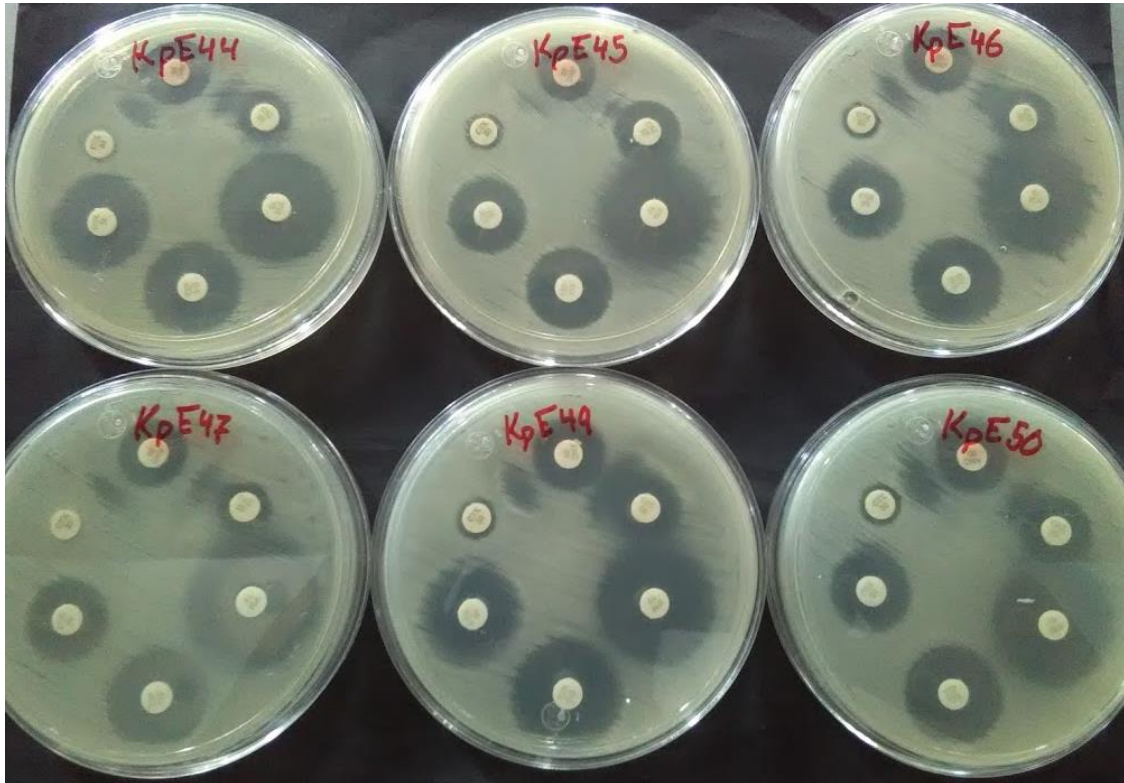


Figura 6. Fenotipo BLEE observado en las cepas de *K. pneumoniae* KpE44 KpE45 KpE46 KpE47 KpE49 y KpE50.

La resistencia conjunta que más se observó en las cepas de *K. pneumoniae* aisladas del Hospital I.S.S.S.T.E de Puebla, fue para las familias de antimicrobianos de cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y quinolonas; siendo observada en un 64.2% (36/56) de las cepas. Se identificaron 37 resistotipos (Tabla 12), siendo 10 en los que se encontró por lo menos dos o hasta 7 cepas compartiendo un solo resistotipo (resistotipos 1-10) y 27 resistotipos que solo se presentaron en una cepa. El resistotipo número 1 fue el que compartieron un mayor número de cepas; todas estas cepas fueron resistentes a 14 antibióticos de los 20 probados en este estudio.

**Tabla 12. Resistotipos encontrados en las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes del hospital ISSSTE.**

Resistotipo	# Antibióticos con fenotipo resistente	Antibióticos específicos a los que fue resistente	Cepas de <i>K. pneumoniae</i> provenientes del Hospital ISSSTE
1	14	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT	7 KpE4, KpE44, KpE46, KpE47, KpE49, KpE50, KpE55
2	14	AMC, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, SXT	4 KpE6, KpE19, KpE32, KpE54
3	13	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, , SXT	3 KpE12, KpE15, KpE62
4	10	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, SXT	3 KpE5, KpE16, KpE70
5	10	TZP, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, AN, GM, NN	3 KpE66, KpE68, KpE69
6	18	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT	2 KpE3, KpE33
7	14	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, AN, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, , SXT	2 KpE25, KpE41
8	15	AMC, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT	2 KpE45, KpE52
9	10	AMC, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, AN, GM, NN	2 KpE76, KpE81
10	9	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, AN, GM, NN	2 KpE77, KpE80
11	13	AMC, TZP, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, NAL, SXT	1 KpE7
12	19	AMC, TZP, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, MEM, TC, AN, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT	1 KpE8
13	13	CZ, CTX, CAZ, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT	1 KpE10
14	11	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, AN, CIP, LVX, NOR, NAL, , SXT	1 KpE11
15	15	TZP, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT	1 KpE14
16	14	AMC, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, SXT	1 KpE19
17	9	AMC, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, GM, NN, SXT	1 KpE22
18	6	TC, CIP, LVX, NOR, NAL, , SXT	1 KpE23
19	11	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, AN, GM, NN, CL, SXT	1 KpE26
20	7	TZP, CZ, CTX, TC, GM, NN, SXT	1 KpE28
21	12	AMC, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, CL, SXT	1 KpE31
22	13	AMC, TZP, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, AN, GM, NN, CIP, SXT	1 KpE38
23	10	AMC, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, SXT	1 KpE39
24	14	TZP, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, SXT	1 KpE40
25	11	AMC, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, SXT	1 KpE42
26	12	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, SXT	1 KpE56
27	15	TZP, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, SXT	1 KpE58
28	11	CZ, CTX, CAZ, FEP, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, SXT	1 KpE1
29	12	CZ, CTX, CAZ, FEP, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, SXT	1 KpE59
30	11	CZ, CTX, FEP, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, SXT	1 KpE60
31	7	CZ, CTX, FEP, TC, GM, NN, SXT	1 KpE64
32	9	CZ, CTX, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, SXT	1 KpE67
33	7	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, SXT	1 KpE72
34	5	CZ, TC, AN, GM, NN	1 KpE74
35	10	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, CIP, LVX, NOR, NAL, SXT	1 KpE75
36	7	CZ, CTX, FEP, ATM, TC, NN, SXT	1 KpE78
37	11	AMC, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, SXT	1 KpE79

AMC: ácido clavulánico, TZP: Piperacilina con tazobactam, CZ: Cefazolina, FOX: Cefoxitina, CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, MEM: Meropenem, IMP: Imipenem, TC: Tetraciclina, AN: Amikacina, GM: Gentamicina, NN: Trobamicina, CIP: Ciprofloxacino, LVX: Levofloxacino, NOR: Norfloxacino, NAL: Ácido nalidíxico, CL: Cloranfenicol, SXT: Trimetoprima con sulfametoxazol.

Las cepas de *K. oxytoca* mostraron los siguientes patrones de resistencia antimicrobiana: las cepas KoE9 y KoE51 presentaron el mismo resistotipo, ya que fueron resistentes a todos los betalactámicos probados, incluidos los carbapenémicos; y a todos los aminoglucósidos probados, sin embargo, no mostraron resistencia a tetraciclinas, quinolonas, anfenicoles y sulfonamidas. La cepa KoE37 fue resistente a los betalactámicos, a excepción del aztreonam, y fue resistente solo un aminoglucósido, la tobramicina, mientras que, no mostró

resistencia a las tetraciclinas, quinolonas, anfenicoles y sulfonamidas. La cepa KoE73 fue resistente a tetraciclinas, aminoglucósidos, quinolonas anfenicoles y sulfonamidas (Tabla 13). El fenotipo BLEE solo se observó en el 25% (1/4) de las cepas, mientras que el fenotipo AmpC no estuvo presente en ninguna de las cepas.

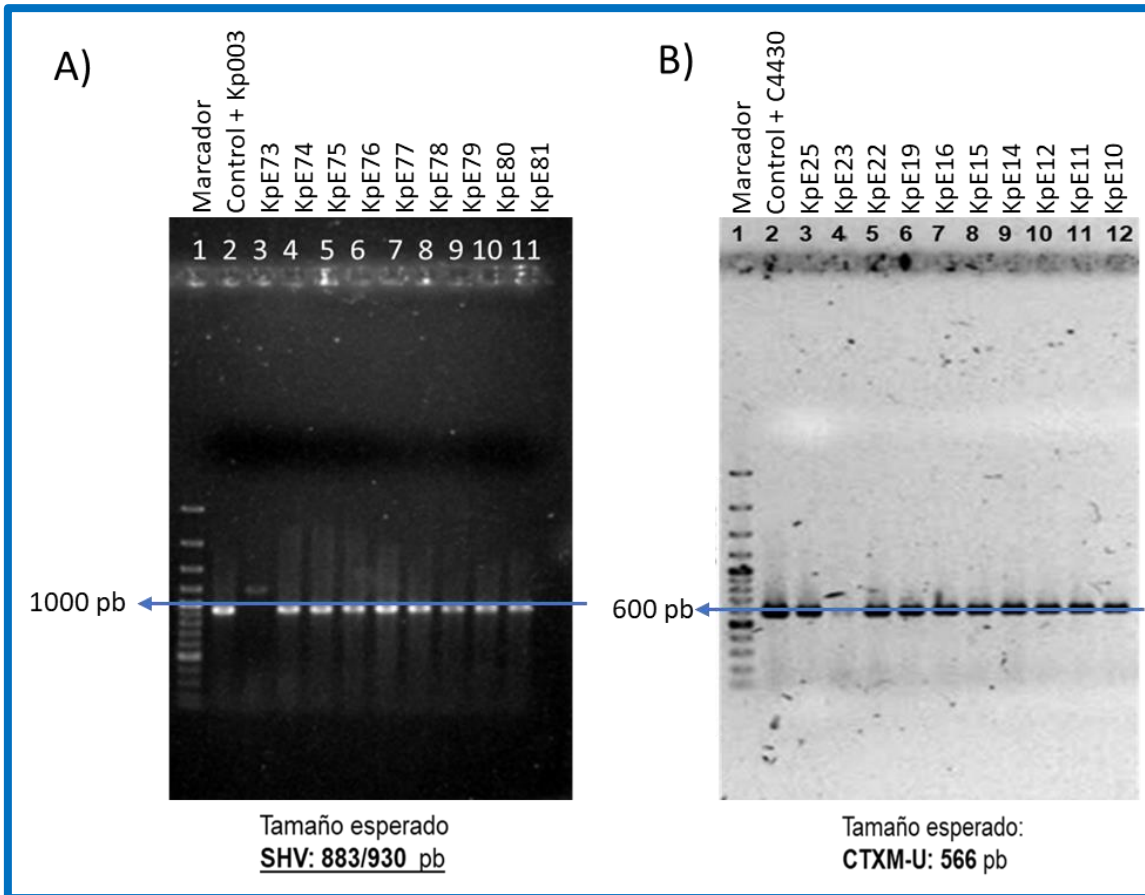
**Tabla 13. Perfil de resistencia y fenotipos observados en las 4 cepas de *K. oxytoca* aisladas de pacientes del Hospital Regional del I.S.S.S.T.E. Puebla.**

Cepa	Perfil de resistencia	Fenotipos	
		BLEE	AmpC
<b>KoE9</b>	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, <b>MEM, IPM</b> , AN, GM, NN.	×	×
<b>KoE37</b>	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, <b>MEM, IMP</b> , NN.	×	×
<b>KoE51</b>	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, <b>MEM, IPM</b> , AN, GM, NN.	✓	×
<b>KoE73</b>	CZ, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT.	×	×

Abreviaturas: AMC: ácido clavulánico, TZP: Piperacilina con tazobactam, CZ: Cefazolina, FOX: Cefoxitina, CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, MEM: Meropenem, IMP: Imipenem, TC: Tetraciclina, AN: Amikacina, GM: Gentamicina, NN: Tobramicina, CIP: Ciprofloxacino, LVX: Levofloxacino, NOR: Norfloxacino, NAL: Ácido nalidíxico, CL: Cloranfenicol, SXT: Trimetoprima con sulfametoxazol, BLEE: Betalactamasa de espectro extendido, AmpC: Enzima tipo AmpC.

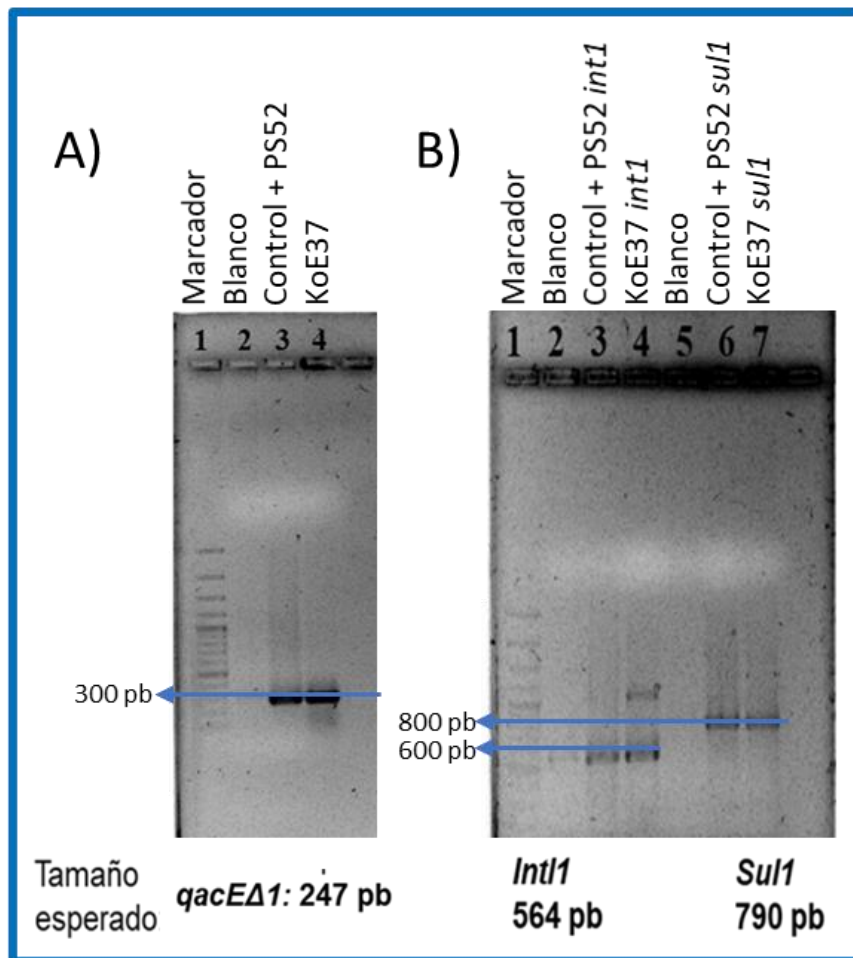
### 8.1.2. Identificación de genes de resistencia

En el 100% (56/56) de las cepas de *K. pneumoniae* de este hospital se encontró el gen *bla<sub>SHV</sub>*, en el 80.3% (45/56) *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>CTXM</sub>* en el 71.4% (40/56); el porcentaje de cepas que presentaron los tres genes fue del 69.6% (39/56) (Figura 7). En la cepa KpE8, que fue resistente a meropenem, no se encontró ninguno de los 4 genes de carbapenemasas que se buscaron en este estudio.



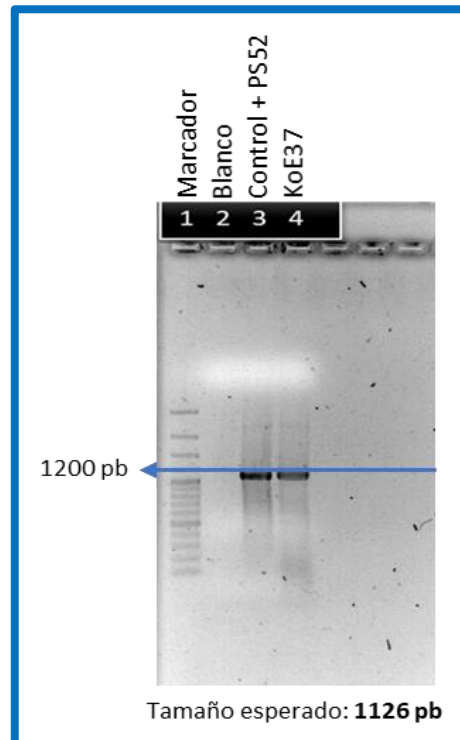
**Figura 7. Productos de PCR de algunas cepas del Hospital I.S.S.S.T.E. para los genes *shv* y *ctxm-u*.** A) Productos de PCR del gen *shv*, se utilizó como control + la cepa de *K. pneumoniae* Kp003. B) Productos de PCR del gen *ctxm-u* universal. Se utilizó como control + la cepa de *E. coli* C4430.

En las 4 cepas de *K. oxytoca* no se encontró el gen *bla<sub>SHV</sub>*, mientras que el gen *bla<sub>TEM</sub>* y el gen *bla<sub>CTXM</sub>* estuvo presente en el 50% (2/4) de las cepas. En las tres cepas resistentes a carbapenémicos, KoE9, KoE37 y KoE51 se identificó al gen *bla<sub>VIM</sub>*. El producto de PCR de *bla<sub>VIM</sub>* de la cepa KoE37 se secuenció, corroborando que se trataba del gen *bla<sub>VIM-23</sub>* (Figura 13). En esta misma cepa se identificaron los genes *int1*, *qacEΔ1* y *sul1* (Figura 8) confirmando la presencia de un integrón de clase 1.



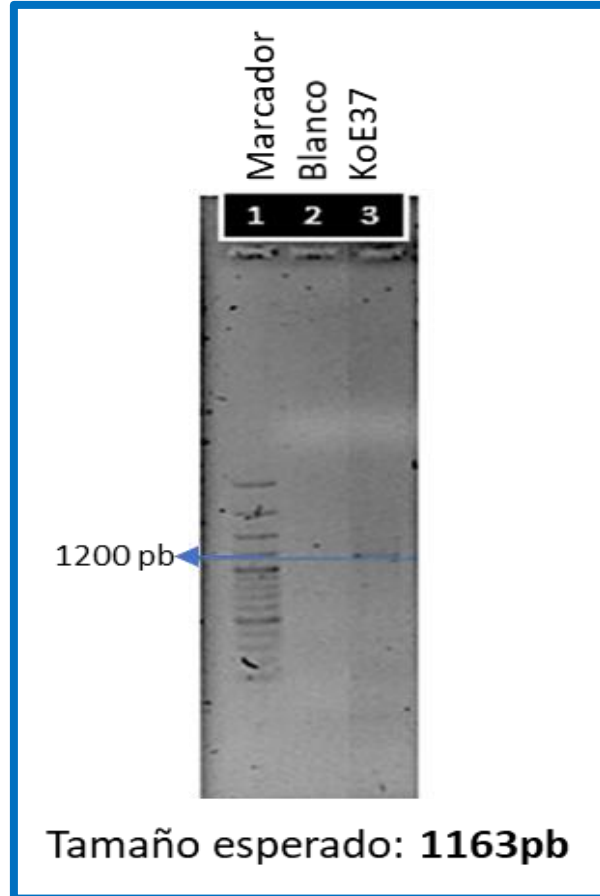
**Figura 8. Productos de PCR en las que se identificaron genes conservados de un integrón clase I, en la cepa KoE37.** A) Productos de PCR en la que se buscó el gen *qacEΔ1*. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: blanco, carril 3: control + PS52, carril 4: *K. oxytoca* del hospital I.S.S.S.T.E número 37 (KoE37), el producto esperado fue de 247pb, coincidiendo con el control positivo. B) Productos de PCR en la que se buscaron los genes *Int1* y *sul1*. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: blanco, carril 3: control + PS52, carril 4: KoE37, el carril 2, 3 y 4 correspondieron a la reacción del gen *int1*, en la que el tamaño esperado fue de 564 pb, coincidiendo con el control positivo. Carril 5: blanco, carril 6: control + PS52, carril 7: KoE37, el carril 5, 6 y 7 correspondieron a la reacción del gen *sul1* en la que se esperaba un producto de 790pb, coincidiendo con el control positivo.

Siguiendo la estrategia de “primer walking” se determinó la posibilidad de que el gen *bla<sub>VIM-23</sub>* se encontrara asociado a un integrón de clase 1. En la primera reacción propuesta (tabla 6 de material y métodos) se evaluó la posibilidad de tener un integrón de clase 1 con estructura conservada, encontrando un producto de entre 1100 y 1150 pb (Figura 9) que corresponde a lo reportado en secuencias de integrones de clase 1 encontrados en *Klebsiella* spp. depositadas en la base de datos Integrall que tienen el gen *qacEΔ1* fusionado al gen *sul1* (número de acceso: KM589496.1).

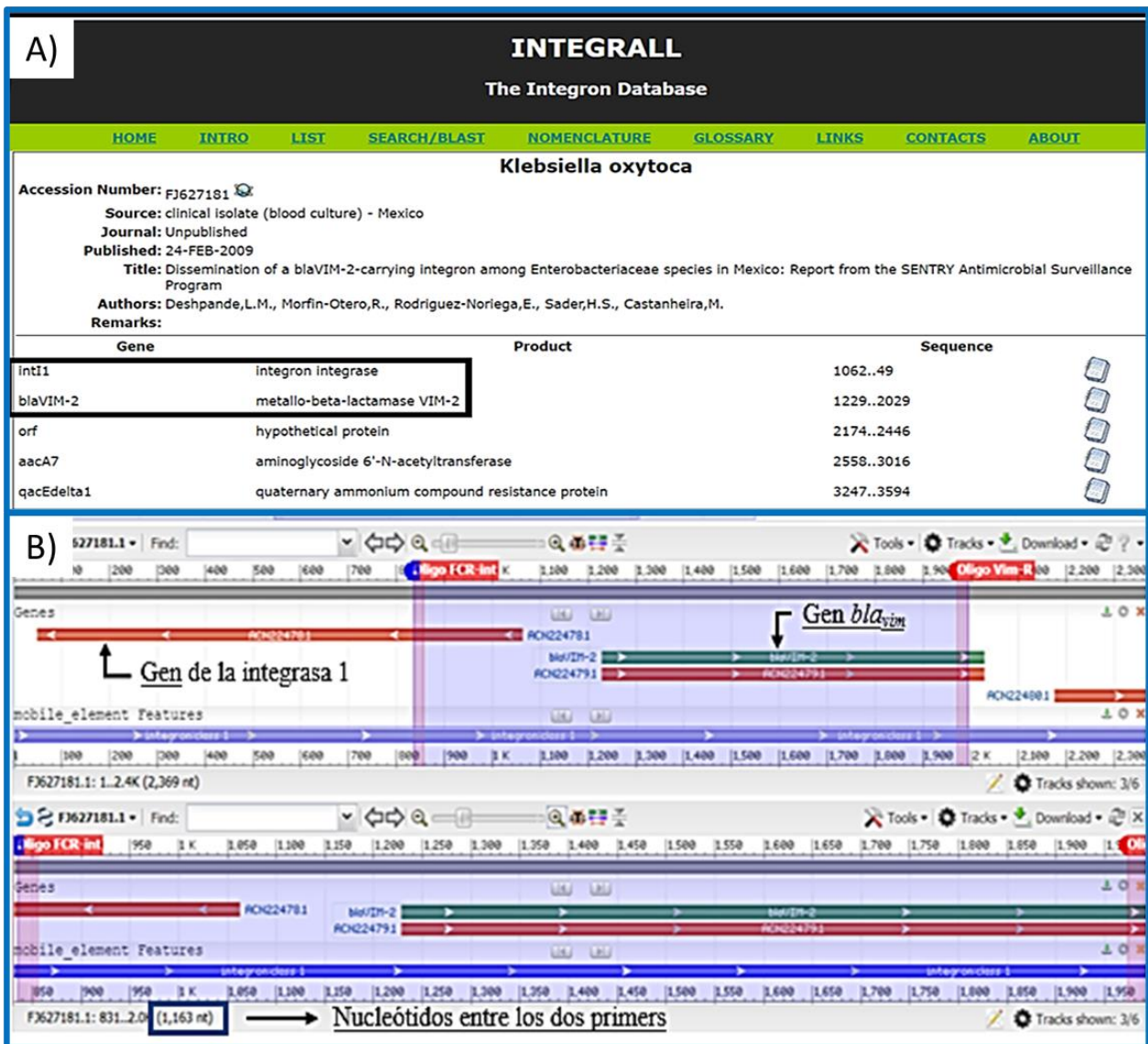


**Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de la reacción Qac-F/Sul-R.** Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: blanco, carril 3: control+ PS52, carril 4: *K. oxytoca* 37 del hospital I.S.S.S.T.E (KoE37). El producto que arrojó esta reacción se encuentra entre la banda de 1000 y 1200 pb, estando más cercana a la banda de 1200, coincidiendo con el control positivo.

En la segunda reacción propuesta se evaluó la posibilidad de que el gen *bla*<sub>VIM-23</sub> se encontrara fusionado al gen *int1*. La reacción arrojó un producto cercano a las 1200 pb (Figura 10); se realizó una búsqueda en la plataforma Integrall de integrones reportados en *Klebsiella* spp. que tuviesen en su estructura el gen *bla*<sub>VIM</sub> después del gen *int1*, eligiendo un integrón de *K. oxytoca* reportada en México (número de acceso: FJ627181.1) en el que posteriormente se realizó un análisis bioinformático en la base datos GenBank donde se localizaron los primers en la secuencia, observando que el tamaño esperado de la región que se amplificaría sería de 1163 pb (Figura 11), corroborando así la posibilidad de que el gen *bla*<sub>VIM-23</sub> encontrado en la cepa *K. oxytoca* 37 del Hospital I.S.S.S.T.E. (KoE37) se encuentre asociado a un integrón de clase 1.

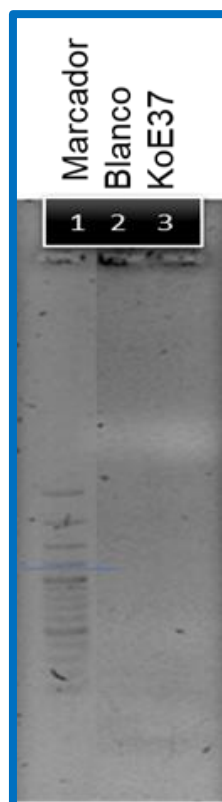


**Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de la reacción FRC-int/Vim-R.** Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: blanco, carril 3: *K. oxytoca* del Hospital I.S.S.S.T.E número 37 (KoE37). La banda que se obtuvo con esta reacción se encuentra cerca de la banda de 1200 pb del marcador de peso molecular y coincide con el tamaño esperado de 1163 pb.



**Figura 11. Características y análisis de la secuencia de un integrón que contiene el gen *bla<sub>VIM-2</sub>* rio arriba del gen *int1*.** A) Captura de la base de datos Integrall con el integrón de número de acceso FJ627181.1 que fue reportado en una cepa de *K. oxytoca* en México y que se utilizó para analizar el producto esperado de la reacción FCR-int/Vim-R. B) Análisis de la región que amplificarían los oligonucleótidos utilizados en la reacción FCR-int/Vim-R si se utilizaran en el mismo integrón, el producto esperado sería de 1163 pb.

Para intentar determinar el tamaño de la región variable se realizó una PCR para amplificar desde el gen *bla<sub>VIM-23</sub>* al gen *sul*, sin embargo, no se obtuvo ningún producto (Figura 12).



**Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de la reacción Vim-F/FRC-sul.** Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: blanco y carril 3: *K. oxytoca* del hospital I.S.S.S.T.E número 37 (KoE37). No se obtuvo ningún producto en esta reacción, por lo que no se determinó la región variable que conforma a este integrón.

## 8.2. Cepas aisladas de pacientes del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla.

Las 6 cepas provenientes de este hospital se recuperaron de 5 pacientes neonatos, hospitalizados en el servicio de UCIN, tres femeninos y dos masculinos, todas las cepas se aislaron de hemocultivo. Cuatro cepas se identificaron como *K. pneumoniae* (KpS1, KpS2, KpS3, KpS5) y 2 como *K. oxytoca* (KoS4 y KoS6); las cepas KpS2 y KpS5 provenían del mismo paciente y fueron aisladas con 7 días de diferencia. Ninguna de estas cepas presentó fenotipo hipermucoide.

### 8.2.1. Perfil de sensibilidad antibiótica

El perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las 4 cepas de *K. pneumoniae* fue muy parecido, todas fueron resistentes a todos los antibióticos probados de las familias de: inhibidores de la betalactamasa, cefalosporinas, monobactámicos,

carbapenémicos, aminoglucósidos y sulfonamidas; y 3 de estas 4 cepas fueron resistentes a quinolonas, KpS3 fue la única con sensibilidad a esta familia. Las cuatro cepas no presentaron fenotipo BLEE ni fenotipo AmpC (Tabla 14).

Las 2 cepas de *K. oxytoca* fueron resistentes a cefalosporinas de tercera generación, monobactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos y sulfonamidas. El fenotipo BLEE se observó en las 2 cepas; mientras que el fenotipo AmpC no se observó en ninguna cepa.

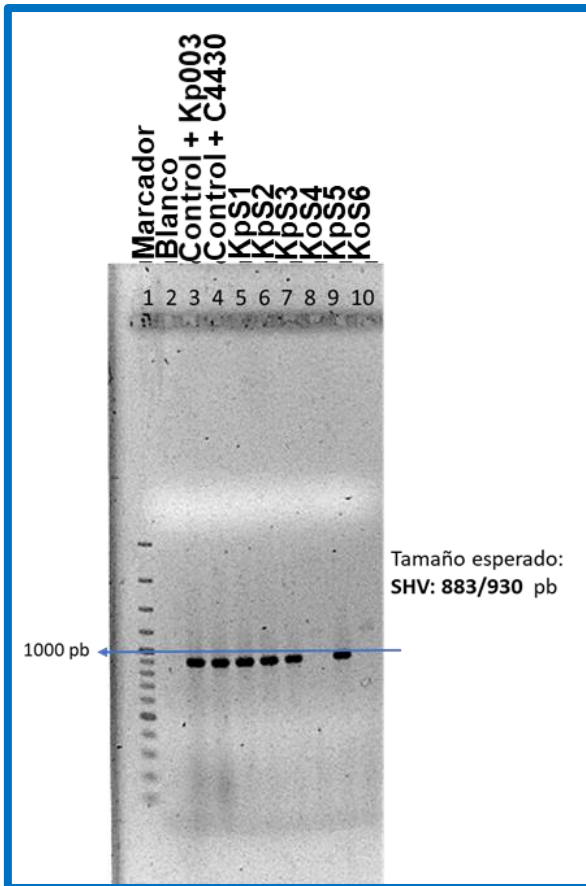
**Tabla 14. Perfil de resistencia y fenotipos observados en las 6 cepas aisladas de pacientes del Hospital General No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla.**

Cepa	Perfil de resistencia	Fenotipos	
		BLEE	AmpC
<i>K. pneumoniae</i>	<b>KpS1</b> AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, <b>MEM, IPM</b> , TC, GM, NN, CIP, SXT.	×	×
	<b>KpS2</b> AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, <b>MEM, IPM</b> , TC, AN, GM, NN, CIP, SXT.	×	×
	<b>KpS3</b> AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, <b>MEM, IPM</b> , TC, GM, NN, SXT.	×	×
	<b>KpS5</b> AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, <b>MEM, IPM</b> , TC, GM, NN, CIP, NOR, SXT.	×	×
<i>K. oxytoca</i>	<b>KoS4</b> CZ, CTX, FEP, ATM, TC, GM, NN, SXT.	✓	×
	<b>KoS6</b> CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, SXT.	✓	×

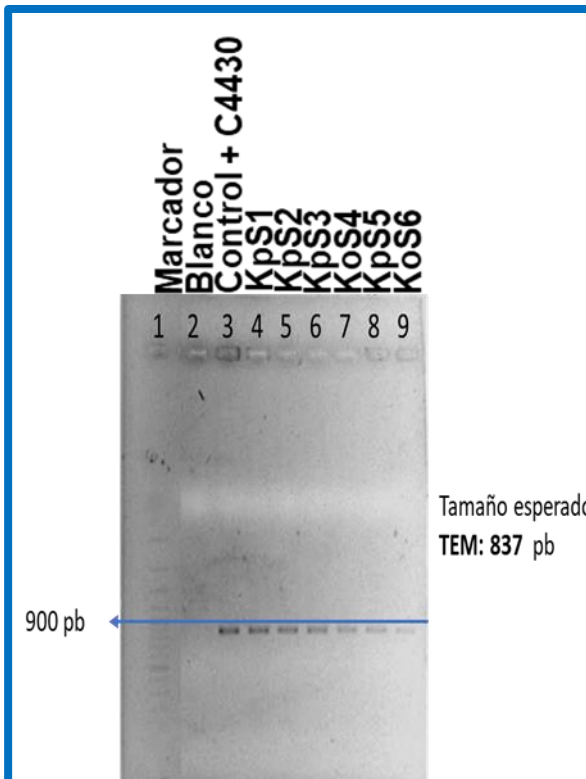
Abreviaturas: AMC: ácido clavulánico, TZP: Piperacilina con tazobactam, CZ: Cefazolina, FOX: Cefoxitina, CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, MEM: Meropenem, IMP: Imipenem, TC: Tetraciclina, AN: Amikacina, GM: Gentamicina, NN: Trobamicina, CIP: Ciprofloxacino, NOR: Norfloxacino, SXT: Trimetoprim con sulfametoxazol, BLEE: Betalactamasa de espectro extendido, AmpC: Enzima tipo AmpC.

### 8.2.2. Identificación de genes de resistencia

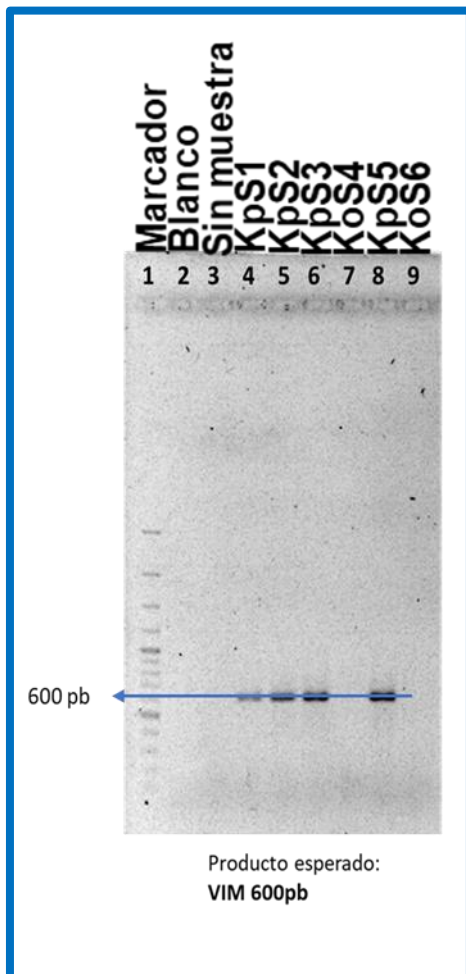
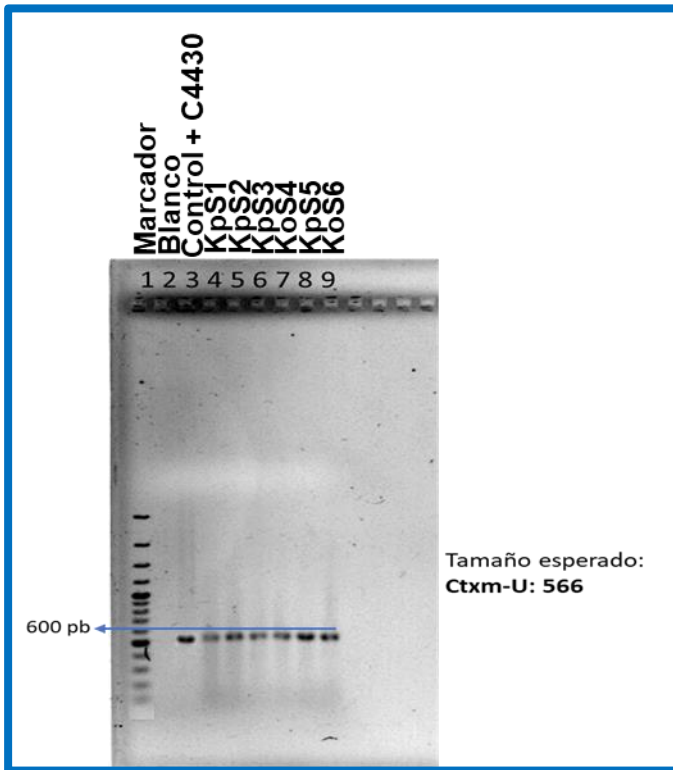
En las cuatro cepas de *K. pneumoniae* se encontraron los genes *bla<sub>SHV</sub>* (Figura 13), *bla<sub>TEM</sub>* (Figura 14), *bla<sub>CTXM</sub>* (Figura 15) y *bla<sub>VIM</sub>* (Figura 16), mientras que las 2 cepas de *K. oxytoca* portaron los genes *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>CTXM</sub>*, pero no los de *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>*.



**Figura 13: Productos de PCR de las 6 cepas del Hospital General No.72 I.M.S.S. Tlalnepantla en la que se buscó al gen *bla*<sub>SHV</sub>.** Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: blanco, carril 3: Control + Kpn003, carril 4: control + *E. coli* 4431, carril 5: KpS1, carril 6: KpS2, carril 7: KpS3, carril 8: KoS4, carril 9: KpS5, carril 10: KoS6. Solo en las cepas del *K. pneumoniae* se identificó el gen *bla*<sub>SHV</sub>.



**Figura 14: Productos de PCR de las 6 cepas del Hospital General No.72 I.M.S.S. Tlalnepantla en la que se buscó al gen *bla*<sub>TEM</sub>.** Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: blanco, carril 3: control + C4430, carril 4: KpS1, carril 5: KpS2, carril 6: KpS3, carril 7: KoS4, carril 8: KpS5, carril 9: KoS6. El gen *bla*<sub>TEM</sub> fue identificado en todas las cepas de este hospital.



Se seleccionó la cepa de *K. pneumoniae* KpS1 para mandar a secuenciar los amplificadores de las PCRs para los genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTXM</sub> y *bla*<sub>VIM</sub> debido a que fue importante para el estudio al tratarse de la primer clona aislada en este hospital que junto con las otras 3 pudieron haber estado implicadas en un brote nosocomial y a que pertenece a la especie de *K. pneumoniae* ya que ya se contaba con una cepa de *K. oxytoca* con el gen de *bla*<sub>VIM</sub> secuenciado. Mediante análisis bioinformático de las secuencias parciales obtenidas se demostró que los genes correspondían a los buscados por PCR y se observó que las variantes con las que comparten mayor semejanza son: *bla*<sub>CTX-M15</sub> (Figura 17), *bla*<sub>TEM-1</sub> (Figura 18) y *bla*<sub>VIM-23</sub> (Figura 19).

KpS1	-----	0
Kpneumoniae/Ctxm-15	ATGGTTAAAAATCACTGCGTCAGTTCACGCTGATGGCGACGGCAACCGTCACGCTGTTG	60
KpS1	-----	0
Kpneumoniae/Ctxm-15	TTAGGAAGTGTGCGCTGTATGCGCAAACGGCGGACGTACAGCAAAACTTGCCGAATTA	120
KpS1	-----	0
Kpneumoniae/Ctxm-15	GAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGCATTGATTAACACAGCAGATAATTCGCAA	180
KpS1	-----G	1
Kpneumoniae/Ctxm-15	ATACTTTATCGTGTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTATGGCCGCG	240
	*	
KpS1	CGTCGGTCGCGGTCTGAGAAGTGAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATC	61
Kpneumoniae/Ctxm-15	GCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAGCGAACCGAATCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATC	300
	* * * * *	
KpS1	AAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCATGGGACGATG	121
Kpneumoniae/Ctxm-15	AAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCATGGGACGATG	360
	*****	
KpS1	TCACTGGCTGAGCTTAGCGCGCCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAG	181
Kpneumoniae/Ctxm-15	TCACTGGCTGAGCTTAGCGCGCCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAG	420
	*****	
KpS1	CTGATTGCTCACGTTGGCGCCCGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGAC	241
Kpneumoniae/Ctxm-15	CTGATTGCTCACGTTGGCGCCCGCTAGCGTCACCGCGTTCGCCCGACAGCTGGGAGAC	480
	*****	
KpS1	GAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCG	301
Kpneumoniae/Ctxm-15	GAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGCGATCCG	540
	*****	
KpS1	CGTGATAACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAATCTGCGGAATCTGACGCTGGTAAA	361
Kpneumoniae/Ctxm-15	CGTGATAACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAATCTGCGGAATCTGACGCTGGTAAA	600
	*****	
KpS1	GCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGCAATACCACCGGT	421
Kpneumoniae/Ctxm-15	GCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGCAATACCACCGGT	660
	*****	
KpS1	GCAGCGAGCATTAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGATAAAAACCGCAGC	481
Kpneumoniae/Ctxm-15	GCAGCGAGCATTAGGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGATAAAAACCGCAGC	720
	*****	
KpS1	GGTGGCTATGGCACCACCAATGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTG	541
Kpneumoniae/Ctxm-15	GGTGGCTATGGCACCACCAACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAAGATCGTGCGCCGCTG	780
	***** *****	
KpS1	ATGCTGGTCACTAAGA-----	557
Kpneumoniae/Ctxm-15	ATTCTGGTCACTTACTTCACCCAGCCTCAACCTAAGGCAGAAAGCCGTCGCGATGTATTA	840
	** ***** *	
KpS1	-----557	
Kpneumoniae/Ctxm-15	GCGTCGGCGGCTAAAATCGTCACCGACGGTTTGTAA876	

**Figura 17. Alineamiento de nucleótidos para el análisis bioinformático del gen *bla*<sub>CTXM</sub>.** La secuencia de la variante *bla*<sub>CTXM-15</sub> reportada en *K. pneumoniae* y depositada en la base de datos GenBank con número de acceso FJ815288.1 se utilizó para comparar la secuencia obtenida de la cepa problema KpS1.

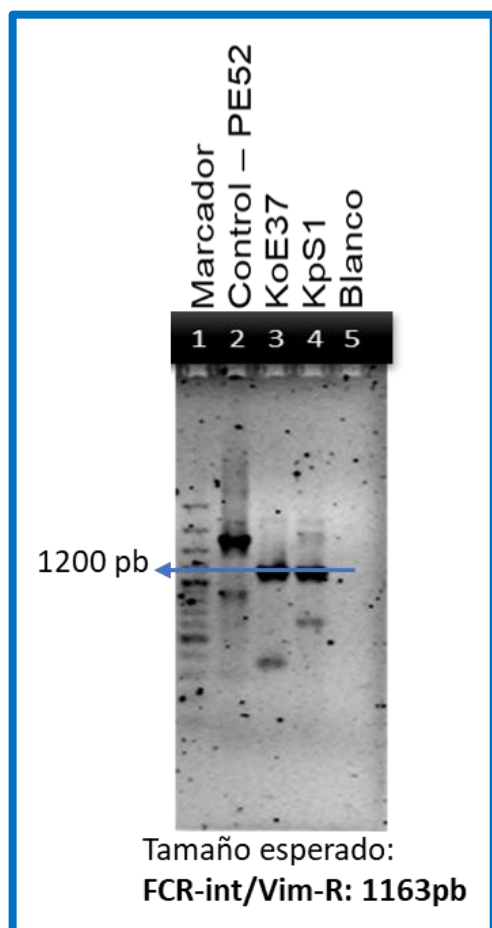


KpneumoniaeVIM-23	ATGTTCAAACCTTTTGGTAAAGTTATTTGGTCTATTTGACCGCTCTATCATGGCTATTGCG	60
KpS1	-----	0
KoE7	-----	0
KpneumoniaeVIM-23	AGTCCGCTCGCTTTTCCGTAGATTCTAGCGGTGAGTATCCGACAGTCAGCGAAATTCCG	120
KpS1	-----	0
KoE7	-----	0
KpneumoniaeVIM-23	GTCGGGAGGTCCGGCTTTACCAGATTGCCGATGGTGGTTGGTCGCATATCGCAACGCAG	180
KpS1	-----TT	2
KoE7	-----	0
KpneumoniaeVIM-23	TCGTTTGTATGCGCGAGTCTACCCGTCCTAATGGTCTCATTGTCCGTGATGGTGTAGAGTTG	240
KpS1	GCACGATGAGGCGCAGTCTACCCGTCCTA-TGGTCTCATTGTCCGTGATGGTGTAGAGTTG	61
KoE7	-----CTACCCGTCCTA-TGGTCTCATTGTCCGTGATGGTGTAGAGTTG	42
	*****	
KpneumoniaeVIM-23	CTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCAGAAAAACACAGCGGCACCTTCGCGGAGATTGAG	300
KpS1	CTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCAGAAAAACACAGCGGCACCTTCGCGGAGATTGAG	121
KoE7	CTTTTGATTGATACAGCGTGGGGTGCAGAAAAACACAGCGGCACCTTCGCGGAGATTGAG	102
	*****	
KpneumoniaeVIM-23	AAGCAAATGGACTTCCTGTAACGCGTGCAGTCTCCACGCACCTTCATGACGACCCGCTC	360
KpS1	AAGCAAATGGACTTCCTGTAACGCGTGCAGTCTCCACGCACCTTCATGACGACCCGCTC	181
KoE7	AAGCAAATGGACTTCCTGTAACGCGTGCAGTCTCCACGCACCTTCATGACGACCCGCTC	162
	*****	
KpneumoniaeVIM-23	GGCGCGTTGATGTCCTTCGGGCGGCTGGGGTGGCAACGTACGCATCACCGTCGACACGC	420
KpS1	GGCGCGTTGATGTCCTTCGGGCGGCTGGGGTGGCAACGTACGCATCACCGTCGACACGC	241
KoE7	GGCGCGTTGATGTCCTTCGGGCGGCTGGGGTGGCAACGTACGCATCACCGTCGACACGC	222
	*****	
KpneumoniaeVIM-23	CGGCTAGCCGAGGTAGAGGGGAACGAGATTCCACGCACCTCTCTAGAAGGACTCTCATCG	480
KpS1	CGGCTAGCCGAGGTAGAGGGGAACGAGATTCCACGCACCTCTCTAGAAGGACTCTCATCG	301
KoE7	CGGCTAGCCGAGGTAGAGGGGAACGAGATTCCACGCACCTCTCTAGAAGGACTCTCATCG	282
	*****	
KpneumoniaeVIM-23	AGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAACTCTTCTATCCTGGTGTGCGCATTCG	540
KpS1	AGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAACTCTTCTATCCTGGTGTGCGCATTCG	361
KoE7	AGCGGGGACGCAGTGCCTTCGGTCCAGTAGAACTCTTCTATCCTGGTGTGCGCATTCG	342
	*****	
KpneumoniaeVIM-23	ACCGACAACCTAGTTGTGTACGTCCCGTCTGCGAGTGTGCTCTATGGTGGTTGTGCGATT	600
KpS1	ACCGACAACCTAGTTGTGTACGTCCCGTCTGCGAGTGTGCTCTATGGTGGTTGTGCGATT	421
KoE7	ACCGACAACCTAGTTGTGTACGTCCCGTCTGCGAGTGTGCTCTATGGTGGTTGTGCGATT	402
	*****	
KpneumoniaeVIM-23	TATGAGTTGTCAAGCACGCTCTGCGGGAAACGTGGCCGATGCCGATCTGGCTGAATGGCCC	660
KpS1	TATGAGTTGTCAAGCACGCTCTGCGGGAAACGTGGCCGATGCCGATCTGGCTGAATGGCCC	481
KoE7	TATGAGTTGTCAAGCACGCTCTGCGGGAAACGTGGCCGATGCCGATCTGGCTGAATGGCCC	462
	*****	
KpneumoniaeVIM-23	ACCTCCATTGAGCGGATTCAACAACACTACCCGGAAGCACAGTTCGTCATTCGCGGGCAC	720
KpS1	ACCTCCATTGAGCGGATTCAACAACACTACCCGGAAGCACAGTTCGTCATTCGCGGGCAC	541
KoE7	ACCTCCATTGAGCGGATTCAACAACACTACCCGGAAGCACAGTTCGTCATTCGCGGGCAC	522
	*****	
KpneumoniaeVIM-23	GGCCTGCCGGCGGTCTAGACTTGCTCAAGCACACAACGAATGTTGTAAGCGCACACA	780
KpS1	GGCCTGCCGGCGGTCTAGACTTGCTCAAAACACACAGCTAAACGATGAGA-----	591
KoE7	GGCCTGCCGGCGGTCTAGACTTGCTCAAGCACACA-----	558
	*****	
KpneumoniaeVIM-23	AATCGCTCAGTCGTTGAGTAGCA	803
KpS1	-----	591
KoE7	-----	558

**Figura 19. Alineamiento de nucleótidos que se llevó a cabo para el análisis bioinformático del gen *bla*<sub>VIM</sub> encontrados en las cepas KpS1 y KoE37.** La secuencia de la variante *bla*<sub>VIM-23</sub> reportada en *E. cloacae* y depositada en la base de datos GenBank con número de acceso NG\_050349.1 se utilizó para comparar con las secuencias obtenidas de las cepas problema KpS1 y KoE7.

Se amplificaron los genes *int1*, *qacEΔ1* y *sul1* en la cepa KpS1 confirmando la presencia de un integrón de clase 1 y por medio de la estrategia “primer walking”

se observó mediante un análisis bioinformático la posibilidad de que el gen *bla*<sub>VIM-23</sub> pudiera estar unido a una integrasa, debido a la amplificación de un producto de alrededor de 1200 pb (Figura 20), que corresponde a las 1163 pb esperadas, tomando como modelo la secuencia de un integrón encontrado en una cepa *K. oxytoca* reportada en México (número de acceso: FJ627181.1).

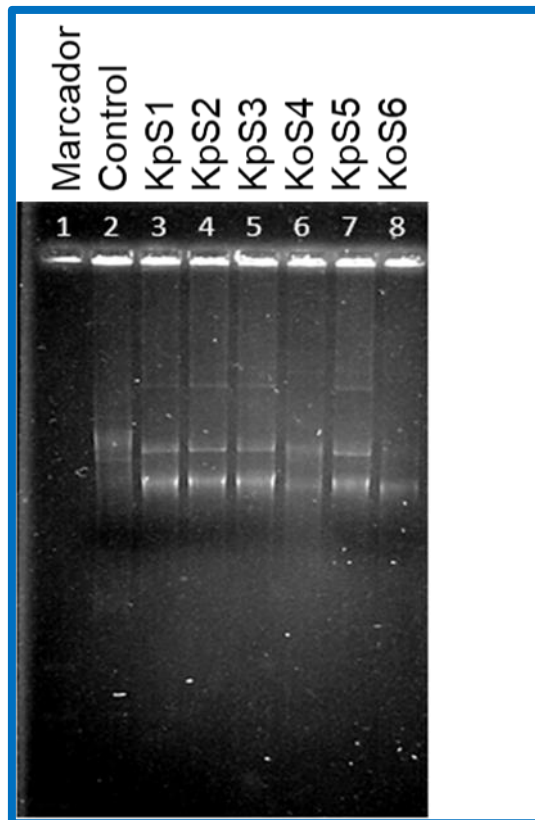


**Figura 20: Productos de PCR del ensayo “primer walking” con la reacción FRC-int/Vim-R llevada a cabo en KpS1 y KoE37.** Carril 1: Marcador de peso molecular, carril 2: Control negativo PE52, carril 3: cepa de *K. oxytoca* aislada del Hospital I.S.S.S.T.E. (KoE37), carril 4: cepa de *K. pneumoniae* aislada del Hospital General No.72 I.M.S.S. Tlalnepantla (KpS1), carril 5: blanco. La cepa KpS1 y la cepa KoE37 mostraron un producto del mismo tamaño que se encuentra cercano a la banda de 1200 pb.

### 8.2.3. Extracción plasmídica de las cepas de *Klebsiella* aisladas de pacientes del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla.

A las 6 cepas aisladas de este hospital se les realizó extracción plasmídica observando 2 patrones de bandeo: uno compartido por las 4 cepas de *K. pneumoniae* (KpS1, KpS2, KpS3, KpS5) y otro por las 2 cepas de *K. oxytoca* (KoS4 y KoS6) (Figura 21). En las cepas de *K. pneumoniae* se logró observar dos bandas plasmídicas y en las cepas de *K. oxytoca* se observó una banda

plasmídica que se encuentra a la misma altura del plásmido más pequeño de las cepas de *K. pneumoniae*.

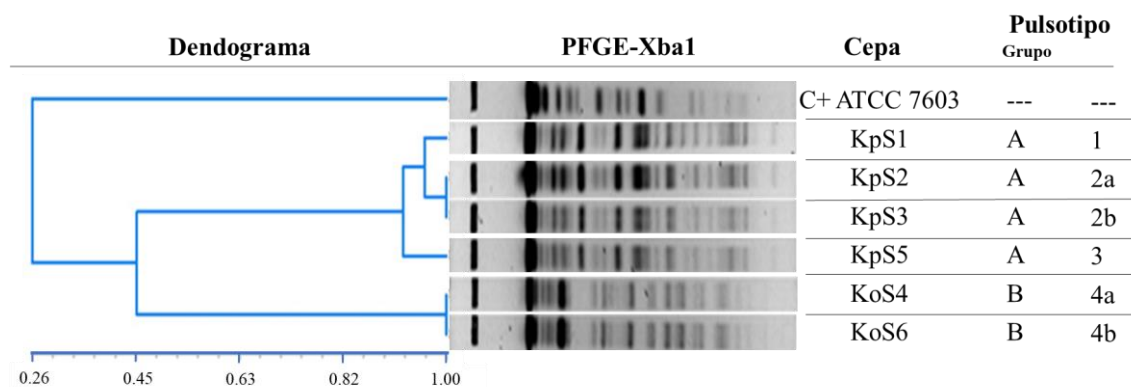


**Figura 21. Perfil plasmídico de las cepas del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla.** Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control, carril 3: KpS1, carril 4: KpS2, carril 5: KpS3, carril 6: KoS4, carril 7: KpS5, carril 8: KoS6. Se puede observar en el carril 3,4,5 y 7 el mismo patrón de bandeos, y en el carril 6 y 8 la misma banda plasmídica a la altura de la banda plasmídica más pequeña de los otros carriles.

#### **8.2.4. Relación Clonal de las cepas de *Klebsiella* aisladas de pacientes del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla.**

Debido a que las 4 cepas de *K. pneumoniae* y las 2 cepas de *K. oxytoca* presentaban semejanzas entre las integrantes de su misma especie como tener el mismo resistotipo, albergar los mismos genes de resistencia antimicrobiana y tener el mismo patrón de bandeos en la extracción plasmídica; se decidió determinar su relación clonal por PFGE-Xba1 (Figura 22). Las cepas fueron distribuidas en 4 pulsotipos por el análisis UPGMA de los patrones de restricción generados, repartidas en dos grupos generados por el coeficiente de Dice que mostraron lo siguiente: en el grupo A se agruparon 4 cepas de *K. pneumoniae*

(KpS1, KpS2, KpS3, KpS5) lo cual nos indica que están genéticamente relacionadas y en el grupo B se encontraron las 2 cepas de *K. oxytoca* (KoS4 y KoS6), las cuales de acuerdo a los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995), son indistinguibles.



**Figura 22. Dendrograma UPGMA, PFGE de los patrones de restricción obtenidos con la digestión enzimática *Xba1* y pulsotipo de las cepas aisladas de pacientes del Hospital General No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla.** La clasificación del Pulsotipo fue realizada con base al análisis de agrupación utilizando el coeficiente de Dice (valor >85%) de acuerdo a los criterios de Tenover (Tenover *et al.*, 1995). Los pulsotipos 1, 2a, 2b y 3 forman el grupo A; y el pulsotipo 4a y 4b forman el grupo B ya que mostraron el mismo coeficiente de DICE (100%). Se usó como control la cepa de *K. pneumoniae* ATCC 7603.

### 8.3. Cepas aisladas de pacientes del Hospital I.S.S.S.T.E.P

Las 3 cepas provenientes de este Hospital se recuperaron de muestras de cultivo de secreción de 3 pacientes masculinos adultos, 2 cepas provenientes del servicio de geriatría y 1 del servicio de cirugía general. Las tres cepas se identificaron como *K. pneumoniae*.

#### 8.3.1. Perfil de sensibilidad.

La cepa KpP2 presento un fenotipo de resistencia a tetraciclinas, quinolonas, anfenicoles, sulfamidas y a los betalactámicos, la cepa KpP6 presentó resistencia a tetraciclinas, aminoglucósidos, quinolonas, anfenicoles, sulfamidas y a los betalactámicos, la cepa KpP7 fue resistente a tetraciclinas, aminoglucósidos, sulfonamidas y a los betalactámicos y las cefalosporinas de segunda generación. Ninguna de las 3 cepas fue resistente a carbapenémicos. Se observó el fenotipo BLEE en las cepas KpP2 y KpP7, mientras que el fenotipo AmpC no se observó en ninguna cepa (Tabla 15).

**Tabla 15. Perfil de resistencia y fenotipos observados en las cepas aisladas de pacientes del I.S.S.S.T.E.P.**

<b>Cepa</b>	<b>Perfil de resistencia</b>	<b>Fenotipos</b>	
		<b>BLEE</b>	<b>AmpC</b>
<b>KpP2</b>	TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, TB, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT.	✓	×
<b>KpP6</b>	TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, TB, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT.	×	×
<b>KpP7</b>	AMC, TZP, CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, SXT.	✓	×

Abreviaturas: AMC: ácido clavulánico, TZP: Piperacilina con tazobactam, CZ: Cefazolina, FOX: Cefoxitina, CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, TC: Tetraciclina, AN: Amikacina, GM: Gentamicina, NN: Trobamicina, CIP: Ciprofloxacino, LVX: Levofloxacino, NOR: Norfloxacino, NAL: Ácido nalidíxico, CL: Cloranfenicol, SXT: Trimetoprima con sulfametoxazol, BLEE: Betalactamasa de espectro extendido, AmpC: Enzima tipo AmpC.

### 8.3.2. Búsqueda de genes de resistencia

En las 3 cepas se encontraron los genes *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* (Cepas KpP2, KpP6, KpP7), mientras que el gen *bla<sub>CTXM</sub>* se encontró solo en una cepa (Cepa KpP2).

## 8.4. Cepas aisladas de pacientes del Hospital para el niño Poblano.

Las 3 cepas de este hospital se recuperaron de 3 pacientes en los que no se especificó el servicio donde se atendieron, y provenían de diferentes sitios anatómicos, 2 aisladas en dos pacientes adolescentes y una en un paciente infantil. Las 3 cepas se identificaron como *K. pneumoniae*.

### 8.4.1. Perfil de sensibilidad

La cepa KpN29 fue resistente a los betalactámicos incluidos los carbapenémicos y a tobramicina. La cepa KpN39 presentó resistencia a tetraciclinas, quinolonas, sulfonamidas y a tobramicina. La cepa KpN24 fue sensible a todos los antibióticos probados. No se observó el fenotipo BLEE ni el AmpC en estas 3 cepas (Tabla 16).

**Tabla 16. Perfil de resistencia y fenotipos observados en las cepas aisladas de pacientes del H.N.P.**

<u>Cepa</u>	<u>Perfil de resistencia</u>	<u>Fenotipos</u>	
		<u>BLEE</u>	<u>AmpC</u>
KpN24	CZ.	×	×
KpN29	AMC, TZP, CZ, FOX, CTX, CAZ, <b>MEM, IMP</b> , TB.	×	×
KpN39	AMC, TC, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, SXT.	×	×

AMC: ácido clavulánico, TZP: Piperacilina con tazobactam, CZ: Cefazolina, FOX: Cefoxitina, CTX: Cefotaxima, CAZ: Ceftazidima, FEP: Cefepime, ATM: Aztreonam, MEM: Meropenem, IMP: Imipenem, TC: Tetraciclina, AN: Amikacina, GM: Gentamicina, NN: Trobamicina, CIP: Ciprofloxacino, LVX: Levofloxacino, NOR: Norfloxacino, NAL: Ácido nalidíxico, CL: Cloranfenicol, SXT: Trimetoprima con sulfametoxazol, BLEE: Betalactamasa de espectro extendido, AmpC: Enzima tipo AmpC.

#### 8.4.2. Búsqueda de genes de resistencia

Las 3 cepas portaron el gen *bla<sub>SHV</sub>* y solo la cepa KpN29 portó el gen *bla<sub>VIM</sub>* y ninguna cepa portó los otros genes buscados.

### 8.5. Laboratorio Clínico Especializado “Los Ángeles” de la ciudad de Puebla.

Las 3 cepas aisladas de este laboratorio se aislaron de muestras de faringe y se recuperaron de tres pacientes diferentes, dos del sexo femenino y una del sexo masculino. Las tres cepas se identificaron como *K. pneumoniae*.

#### 8.5.1. Perfil de sensibilidad

Las 3 cepas presentaron sensibilidad a todos los antimicrobianos probados y se observó el fenotipo BLEE ni AmpC en ninguna de estas cepas (Tabla 17).

**Tabla 17. Perfil de resistencia y fenotipos observados en las cepas aisladas de pacientes del Laboratorio Clínico.**

<u>Cepa</u>	<u>Perfil de resistencia</u>	<u>Fenotipos</u>	
		<u>BLEE</u>	<u>AmpC</u>
KpLC9	Sensible	×	×
KpLC10	Sensible	×	×
KpLC19	Sensible	×	×

### 8.5.2. Búsqueda de genes de resistencia

Se encontró al gen *bla*<sub>SHV</sub> en las tres cepas, mientras que no portaron ninguno de los otros genes buscados.

### 8.6. Cepas hipermucoides

A todas las cepas estudiadas de los diferentes hospitales se les realizó el estudio de “prueba fenotípica de cuerda” en busca de cepas hipermucoides. Se encontraron 9 cepas hipermucoides, todas de la especie *K. pneumoniae*. Cinco provenientes del Hospital I.S.S.S.T.E., de las cuales la cepa KpE23 generó un “hilo mucoso” de hasta 4 cm y las cepas KpE46, KpE47, KpE49 y KpE50, las cuales fueron aisladas del mismo servicio hospitalario y que presentaron un “hilo mucoso” de 0.5 cm. Las cepas KpE46, KpE47 y KpE50 fueron aisladas de un mismo paciente en diferentes fechas. Las 5 cepas de este hospital presentaron resistencia antimicrobiana. Otras tres cepas provenientes del Laboratorio Clínico “Los Ángeles”, aisladas de infecciones de la comunidad, KpLC9, KpLC10 y KpLC19, presentaron “hilos mucosos” de hasta 5 cm y todas mostraron sensibilidad a los antibióticos probados. Por último, una cepa del Hospital para el Niño Poblano, la cepa KpN24 presentó un “hilo mucoso” de hasta 5 cm también y fue sensible a los antibióticos. En ninguna de las 9 cepas hipermucoides de este estudio se encontró el gen *rmpA* asociado al fenotipo hipermucoso (tabla 18), por lo que se podría deber a mutaciones en alguno de los otros genes reportados en la literatura como responsables del fenotipo mucoso entre los que se encuentran el gen *wzy* y el cluster de genes *cps* (Paczosa y Meccas, 2016).

**Tabla 18. Datos principales de las cepas hipermucoides.**

Clave cepario	Hospital	Origen de la muestra	Servicio Hospitalario	Perfil de resistencia	Valor de cuerda "Hilo mucoide"	Amplificación del gen <i>rmpA</i>
KpE23	ISSSTE	Urocultivo	Urología	TC, CIP, LVX, NOR; NAL, SXT.	> 5cm	Negativo
KpE46*	ISSSTE	Lavado Broncoalveolar	Medicina Interna	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT.	>0.5 cm	Negativo
KpE47	ISSSTE	Urocultivo	Medicina Interna	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT.	>0.5 cm	Negativo
KpE49*	ISSSTE	Lavado Broncoalveolar	Medicina Interna	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT.	>0.5 cm	Negativo
KpE50*	ISSSTE	Hemocultivo periférico	Medicina Interna	CZ, CTX, CAZ, FEP, ATM, TC, GM, NN, CIP, LVX, NOR, NAL, CL, SXT.	>0.5 cm	Negativo
KpLC9	Lab. Clínico	Faringe	N/A	Sensible a los antibióticos	> 5cm	Negativo
KpLC10	Lab. Clínico	Faringe	N/A	Sensible a los antibióticos	> 5cm	Negativo
KpLC19	Lab. Clínico	Faringe	N/A	Sensible a los antibióticos	> 5cm	Negativo
KpN29	HNP	Líquido de Pleura	S/D	CZ	> 5cm	Negativo

\*Las cepas KpE46, KpE49 y KpE50 fueron aisladas del mismo paciente. En ninguna de las 9 cepas se encontró el gen *rmpA*.

## 9. DISCUSIÓN

Se incluyeron en el estudio un total de 75 cepas, 69 cepas de *K. pneumoniae* y 6 cepas de *K. oxytoca*, lo que hace evidente el alto número de infecciones causadas por *K. pneumoniae* a diferencia de *K. oxytoca*. Especialistas en el género han calculado que la relación de infecciones causadas por estas especies es de 4 a 1 (Brisse *et al.*, 2006), respectivamente; aunque bajo los criterios utilizados en este estudio la proporción fue mucho mayor, siendo de 11.5 a 1, debido, principalmente a que se buscaron y se seleccionaron cepas multidrogorresistentes, y *K. pneumoniae* es la especie clínicamente más importante de este género y la que más ha adquirido determinantes de resistencia en los últimos años (Paczosa y Meccas, 2016).

Las cepas son provenientes de 4 hospitales mexicanos, de donde se obtuvieron aislados de infecciones nosocomiales, y de un laboratorio privado de la ciudad de Puebla, del que se obtuvieron cepas provenientes de infecciones adquiridas en la comunidad. El servicio hospitalario de donde se aislaron más cepas fue Medicina Interna, seguido de UCIN y Pediatría, similar a lo observado en varios estudios de vigilancia epidemiológica alrededor del mundo (Magill *et al.*, 2014; Chetcuti *et al.*, 2014); encontrando que los grupos de edad principalmente afectados fueron: neonatos en primer lugar, infantes en segundo lugar y adultos mayores en tercer lugar, semejante a lo que se ha reportado en México (Rodríguez, 2018; RHOVE, 2017) y el mundo (Brisse *et al.*, 2006; Magill *et al.*, 2014; EARS, 2018). Los principales orígenes de las muestras fueron urocultivo, hemocultivo y lavado bronco-alveolar, que corresponde a los principales sitios de infección conocidos del género *Klebsiella* spp. (Paczosa y Meccas, 2016; Bengoechea y Sa Pessoa, 2019).

El 65.2% (43/69) de las cepas de *K. pneumoniae* de este estudio fue resistente a cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y quinolonas, perfil de resistencia que concuerda con lo reportado en estudios de vigilancia epidemiológica de *Klebsiella* spp. en Europa (EARS, 2018), E.E.U.U. (Magill *et al.*, 2014) y México (RHOVE, 2017). Este fenotipo de resistencia es de gran preocupación al tratarse de las familias de antimicrobianos que son utilizadas como primera elección en la práctica médica, dejando como última opción el uso

de carbapenémicos, familia a la que fue resistente el 8.69% (6/69) de las cepas de *K. pneumoniae* y el 50% (3/6) de las cepas de *K. oxytoca*, y en la que también se ha observado un incremento en la resistencia en los últimos años (Rodríguez *et al.*, 2018), por lo que se complica aún más el tratamiento de este tipo de infecciones en las que las opciones son cada vez menores.

La Cefoxitina [18.66% (14/75)], la Amikacina [25.33% (19/75)] y el Cloranfenicol [26.66% (20/75)], fueron los antimicrobianos con tasas de resistencia más bajas en este estudio, lo cual, de igual manera concuerda con lo reportado por diversos estudios de vigilancia epidemiológica (EARS, 2018; RHOVE, 2017). Estos antimicrobianos podrían ser utilizados como segunda opción ante infecciones complicadas, además de que ya han sido probados y analizados en diferentes estudios para el tratamiento de infecciones ocasionadas por el género *Klebsiella*, por ejemplo, la Amikacina fue puesta a prueba como terapia combinada junto con la polimixina B para eliminar cepas de *K. pneumoniae*, encontrando que esta combinación potencia a ambos antimicrobianos, requiriendo de cantidades mucho menores para eliminar a la bacteria a diferencia de la monoterapia (Montgomery *et al.*, 2014).

En otro estudio el cloranfenicol de igual manera fue usado junto con la polimixina B para eliminar cepas multidrogo-resistentes de *K. pneumoniae* productoras del gen *bla<sub>NDM</sub>*, siendo efectivo además para que las cepas no desarrollaran resistencia a ninguno de los dos antimicrobianos (Rahim *et al.*, 2015); y en el caso de la cefoxitina se realizó un estudio retrospectivo que evaluó la eficacia de su uso para infecciones del tracto urinario causadas por *K. pneumoniae* y *E. coli* en el que se concluyó que la cefoxitina es una opción viable para no desarrollar bacterias portadoras de genes BLEE (Senard *et al.*, 2019).

El fenotipo BLEE se observó en el 69.3% (52/75) de las cepas; sin embargo, en el 93.3% (70/75) se encontró algún gen codificante para BLEE, ya fuese *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, o más de uno de estos genes; la razón por la cual no se observó el fenotipo en estas cepas a pesar de portar genes capaces de codificar para alguna BLEE puede deberse a que las enzimas que portan estas cepas podrían ser variantes que ya no son inhibidas por el ácido clavulánico debido a cambios en la estructura de la proteína por modificaciones en los aminoácidos (Bush y

Jacoby, 2010); lo que hace necesario en posteriores estudios realizar otras técnicas fenotípicas más sensibles y específicas para la detección de BLEEs como la de ESBL NDP-test (Deepa, *et al.*, 2017) y mandar a secuenciar los genes obtenidos por PCR de estas cepas para identificar las variantes que portan.

El fenotipo AmpC no se observó en ninguna de las cepas, ya que este tipo de enzimas se encuentran principalmente en otras especies de la familia *Enterobacteriaceae* como *E. cloacae*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *E. coli* en las que se da como resistencia inducible a través de genes *ampC* o resistencia cromosómica no inducible debida a mutaciones del promotor y/o atenuador; y se llega a encontrar con menor frecuencia en las especies del género *Klebsiella* spp. a través de resistencia mediada por plásmidos (Tamma *et al.*, 2019), caso que no fue observado en este estudio.

Se buscaron en todas las cepas los genes codificantes para las betalactamasas de espectro extendido *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>CTX-M</sub>*; que son consideradas las BLEE clínicamente más significativas (Liakopoulus *et al.*, 2016). El gen *bla<sub>SHV</sub>* se encontró en un 93.3% (69/75) de las cepas, que corresponde al 100% (69) de las cepas de *K. pneumoniae*, gen que es considerado como ubicuo en esta especie (Babini y Livermore, 2000), mientras que en la especie de *K. oxytoca* no se encontró en ninguna cepa a pesar de existir reportes aislados en los que se ha encontrado esta enzima en plásmidos. El gen *bla<sub>TEM</sub>* que al día de hoy cuenta con más de 200 variantes ampliamente distribuidas por toda la familia *Enterobacteriaceae* (Palzkill, 2018), fue encontrado en el 80% (60/75) de las cepas y el gen *bla<sub>CTX-M</sub>*, que se ha propagado rápidamente en las bacterias Gram negativas y al día de hoy es el principal tipo de BLEE que se disemina a nivel mundial (Zhang *et al.*, 2016) se encontró en el 72% (54/75) de las cepas. Todas las cepas de este estudio presentaron al menos uno de los tres genes codificantes para BLEE que se buscaron y un 57.3% (43/75) presentó los tres genes, esta confluencia de los tres genes ha sido reportada en otras partes del mundo como, por ejemplo: en aislados de infecciones del tracto urinario de un hospital Iraní, en el que se reportó un 10.8% de cepas portadoras de los tres genes (Dehshiri *et al.*, 2018) y en aislados de infecciones comunitarias en China

en las que se encontró que el 8.7% albergaban en concomitancia los genes *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>CTX-M</sub>* (Zhang *et al.*, 2016). Los porcentajes de portación de genes BLEE que se obtuvieron en este estudio son más grandes comparados a los reportados en otros estudios que de forma aislada han estudiado cepas de un solo hospital o una sola región, estudios que prevalecen en la literatura, sin embargo, en estudios en los que se ha analizado la prevalencia de genes BLEE a nivel mundial colocan cifras que son más comparables con las obtenidas en este estudio como el realizado por Rossolini y colaboradores en el año 2008 en el que por ejemplo reportaron tasas de hasta un 58.5% en la portación de CTX-M en aislados de *K. pneumoniae* en Taiwan.

En este estudio se detectaron 9 cepas resistentes a los carbapenémicos, 4 provenientes del hospital I.S.S.S.T.E. (KpE8, KoE9, KoE37, KoE51), 4 provenientes del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla (KpS1, KpS2, KpS3, KpS5) y 1 del Hospital para el Niño Poblano (KpN29). En la cepa KpE8 del Hospital I.S.S.S.T.E. no se encontró ningún gen codificante de carbapenemasas de los buscados, por lo que sería importante buscar en estudios posteriores otro tipo de enzimas que no se buscaron en este estudio y que ya han sido reportadas en *K. pneumoniae* como por ejemplo *bla<sub>OXA-48</sub>* o determinar si esta resistencia se debe a otro mecanismo como la disminución de la permeabilidad celular (Porinas) o a la expulsión activa de antibióticos (Bombas de expulsión). En las otras 8 cepas se encontró el gen *bla<sub>VIM</sub>*, el cual se ha diseminado ampliamente en la familia *Enterobacteriaceae*, principalmente en *K. pneumoniae*, desde su descubrimiento en el año de 1997 en Italia, por lo que es considerado como endémico en la región mediterránea Europea; sin embargo, en los últimos años ha crecido el número de reportes fuera de esta región, siendo de especial preocupación el aumento significativo en la región latinoamericana (Nordmann *et al.*, 2011; Tzouveleakis *et al.*, 2012; Walsh *et al.*, 2005).

En dos cepas seleccionadas para secuenciar el gen, se identificó la variante *bla<sub>VIM-23</sub>*, variante que recientemente en dos estudios epidemiológicos de la distribución global de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae*, se determinó su presencia en México, ya que no es común encontrarla en otros países a diferencia de *bla<sub>VIM-1</sub>* que tiene una distribución global o *bla<sub>VIM-29</sub>* que está

presente en Arabia Saudí e Inglaterra (Matsumura *et al.*, 2017; Kazmierczak *et al.*, 2016). Las cepas en las que se identificó la variante *bla*<sub>VIM-23</sub> fueron KoE37 que proviene del Hospital I.S.S.S.T.E. y que pertenece a la especie *K. oxytoca* y la cepa KpS1 proveniente del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla y que pertenece a la especie *K. pneumoniae*, cepas en las que posteriormente se identificaron los genes *int1*, *qacEΔ1* y *sul1* característicos de los integrones de clase 1. Sabiendo que los genes de carbapenemasas que porta *K. pneumoniae* son transportados por elementos genéticos movilizables, incluidos plásmidos y transposones e integrones que les permiten ser diseminados de fácil manera a otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* y que particularmente el gen *bla*<sub>VIM</sub> es común encontrarlo asociado a estructuras de integrones de clase 1, ubicadas dentro de transposones que a su vez son transportados en diferentes tipos de plásmidos de amplio rango de hospedero (Pitout *et al.*, 2015), se decidió llevar a cabo la estrategia “primer walking” con la que se analizó la posibilidad de que el gen *bla*<sub>VIM-23</sub> se encontrara asociado a un integrón de clase 1. De esta manera se encontró mediante análisis bioinformático, la posible relación del gen *bla*<sub>VIM-23</sub> con un integrón de clase 1 en las cepas KoE37 y KpS1, que de ser confirmado en futuros estudios en los que se determine al 100% la estructura de estos integrones, resultaría interesante al tratarse de dos cepas provenientes de hospitales diferentes, de especies diferentes y aisladas en un periodo de tiempo diferente que podrían contener estructuras similares en las que albergan al gen *bla*<sub>VIM-23</sub>. De ser así no sería este el primer reporte en el que el gen *bla*<sub>VIM</sub> se encuentra con estructuras similares a nivel intergénero en México, puesto que en el año 2009 Morfín-Otero y colaboradores reportaron dos aislados de *E. cloacae* y uno de *K. oxytoca* que acarreaban el gen *bla*<sub>VIM-2</sub> en un integrón que a su vez era acarreado por un plásmido de 450 kb.

En las 4 cepas de *K. pneumoniae* del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla resistentes a los carbapenémicos, que comparten el grupo A de los pulsotipos en la PFGE-Xba1, se podría pensar que estuvieron implicadas en un brote intrahospitalario de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal (UCIN) por el periodo de tiempo de aislamiento (Anexos 1) y su relación clonal. Se tendría que complementar este estudio con un análisis retrospectivo de un periodo de

tiempo más amplio de las IAAS reportadas en este hospital para determinar realmente el alcance que pudo haber tenido esta clona; sin embargo, es importante tener en cuenta que *K. pneumoniae* es la especie bacteriana más aislada de UCIN en todo el mundo (Magill *et al.*, 2014; EARS, 2018; RHOVE, 2017).

Estas estadísticas no son observadas en ningún otro servicio de salud hospitalario, por lo que los brotes en UCIN causados por bacterias del género *Klebsiella* spp. productoras de BLEE y/o carbapenemasas, son una constante con la que se han enfrentado todos los sistemas de salud pública del mundo (Podschun y Ullman, 1998) y que por la presión selectiva que ejerce el uso indiscriminado de antibióticos han incrementado en los últimos años (Banerjee *et al.*, 2016; Chung The *et al.*, 2015). Como antecedente específico de este estudio, es un trabajo de maestría realizado en nuestro grupo de investigación en el que se detectó un brote en la UCIN del Hospital San Alejandro I.M.S.S. de Puebla en el que se vieron involucradas 24 cepas de *K. pneumoniae*.

En Europa es en donde se han abordado de mejor manera estos casos, se han hecho estudios para entender la rápida diseminación del patógeno y su comportamiento durante brotes epidémicos (Fabbri *et al.*, 2013; Herruzo *et al.*, 2017), llegando a implementar medidas drásticas como el cierre de una UCIN en Alemania durante más de 3 años hasta esclarecer las causas del brote, después de darse a conocer en medios de comunicación y atraer la atención pública (Haller *et al.*, 2015); y otros en los que se han analizado los factores de riesgo que presentan los neonatos ante una infección de este tipo (Auriti *et al.*, 2003). A través de estos estudios, se concluye que es muy importante no subestimar el alcance que pueden tener este tipo de infecciones, por lo que se deben establecer sistemas de vigilancia para la detección de brotes con una evaluación estandarizada y ante la menor sospecha tomar medidas drásticas como el aislamiento de los neonatos sin posibilidad de ver a sus familiares, el cierre de las unidades y la sanitización constante de toda la unidad incluidos desagües y vías de ventilación, además de reforzar las medidas de seguridad sanitaria entre el personal médico de este servicio para poder controlar la extensión del brote, confirmar las rutas de transmisión e identificar las fuentes probables de

contaminación. Este tipo de estudios debe hacerse de manera más frecuente para conocer que sucede en hospitales mexicanos y tomar las medidas necesarias para contener las infecciones nosocomiales causantes por este tipo de microorganismos MDR.

En este estudio se reportaron 9 cepas hipermucoides, 3 de estas cepas fueron aisladas de infecciones adquiridas en la comunidad en pacientes jóvenes y presentaron sensibilidad a los antimicrobianos, características principales de las cepas “hipervirulentas” (Catalán *et al.*, 2017; Garza-Ramos *et al.*, 2018), mientras que las otras 6 cepas fueron aisladas de infecciones nosocomiales en adultos mayores, con diferentes niveles de resistencia a los antimicrobianos, características menos frecuentes en las cepas “hipervirulentas” pero que se han llegado a reportar en diferentes estudios, principalmente los realizados en países asiáticos (Lee *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2016), como el realizado por Guo y colaboradores en el año 2017 en el que de un total de 389 cepas se encontraron 84 hipermucoides y 4 de estas fueron resistentes a los carbapenémicos, mientras que en los países occidentales son muy pocos los reportes de resistencia en este tipo de cepas. La resistencia antimicrobiana en las cepas hipervirulentas ha llevado el mismo camino que el de las cepas clásicas en las que se ha observado que en los ambientes intrahospitalarios tienden a adquirir determinantes de resistencia debido a la presión de selección ocasionada por el uso de antimicrobianos pero en este caso es un doble riesgo al mantener sus genes que le confieren hipervirulencia por lo que representan un doble riesgo en caso de volverse MDR (Shon *et al.*, 2013)..

En las nueve cepas se buscó el gen *rmpA* y no se encontró en ninguna de ellas, demostrando así que la hiperproducción capsular está siendo adquirida por otros mecanismos, como lo podrían ser: mutaciones en el gen *wzy* que codifica para una polimerasa que es esencial para la formación de la estructura característica de la cápsula o mutaciones en el cluster de genes *cps* que contiene genes encargados de sintetizar, ensamblar y trasladar componentes del polisacárido capsular de *K. pneumoniae* (Catalán *et al.*, 2017).

Ninguna de estas cepas causó infecciones sistémica, como, meningitis o absceso hepático, y tampoco causaron infección en tejidos blandos, como

endofthalmitis o fascitis, infecciones que están relacionadas con las cepas hipervirulentas adquiridas en la comunidad (Pomakova *et al.*, 2012), y que en algunos estudios priorizan determinar para correlacionar su fenotipo con su virulencia y así poder relacionarlas a cepas consideradas “hipervirulentas” que fueron reportadas por primera vez en los países del sudeste asiático en los que al día de hoy es un grave problema de salud pública (Shon *et al.*, 2013). Sin embargo, en los países occidentales han ido en aumento los aislados de cepas que cumplen con el fenotipo y que albergan algún gen implicado en la hiperproducción de capsula, pero que no son causantes de las infecciones como las observadas en el sudeste asiático (Alcántar-Curiel y Girón, 2015).

Derivado de múltiples discusiones para determinar cuáles son las características específicas de una cepa “hipervirulenta”, se ha llegado a considerar que no todas las cepas hipermucoides son precisamente hipervirulentas, ni es necesario que los aislados causen infecciones específicas, ni se reservan a un solo mecanismo de hiperproducción capsular (Catalán *et al.*, 2017; Broberg *et al.*, 2014), por lo que aun cabe la posibilidad de que las cepas hipermucoides de este estudio puedan llegar a ser consideradas como cepas “hipervirulentas”, aunque haría falta determinar en futuros estudios los genes implicados en la hiperproducción capsular y genes de virulencia asociados al fenotipo hipermucoide como el cluster de genes *iro* que codifican para el sideróforo salmochelina, el cluster de genes *iuc* que codifican para el sideróforo aerobactina y el gen *allS* que está asociado al metabolismo de alantoína. .

## 10. CONCLUSIONES

En este estudio se encontraron cepas multidrogoresistentes de *K. pneumoniae* y en menor número *K. oxytoca* causantes de infecciones nosocomiales y portadoras de los genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>CTX-M</sub>*.

El fenotipo de resistencia conjunta a cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y quinolonas fue común en las cepas de *K. pneumoniae*.

Las cepas de *K. oxytoca* presentaron resistencia a carbapenémicos más que en *K. pneumoniae*. La mayoría de estas cepas fueron portadoras del gen *bla<sub>VIM</sub>* y en dos cepas de diferente especie y de diferentes hospitales se identificó el *bla<sub>VIM-23</sub>*, siendo este el primer reporte en *Klebsiella*.

Las cepas de *K. pneumoniae* del Hospital General No.72 I.M.S.S. Tlalnepantla compartieron semejanzas en el perfil plasmídico y tuvieron relación clonal, por lo que podrían haber estado implicadas en un brote nosocomial de la UCIN.

Se identificaron cepas hipermucoides aisladas de infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. Las cepas nosocomiales presentaron resistencia antimicrobiana, mientras que las cepas de la comunidad fueron sensibles y en estas últimas el fenotipo hipermucoide fue mayor. Este hallazgo es de especial interés por representar un riesgo en el ambiente nosocomial, ya que puede complicar el tratamiento.

## 11. PERSPECTIVAS

1. Determinar los mecanismos de resistencia en todas las cepas para otras familias de antibióticos como aminoglucósidos y quinolonas.
2. Identificar las variantes de los genes *bla*<sub>VIM</sub> de las cepas faltantes
3. Determinar el entorno genético de los genes *bla*<sub>VIM-23</sub> e identificar si estos son acarreados en integrones y plásmidos que podrían facilitarles su diseminación.
4. Identificar los genes implicados en la hiperproducción capsular de las cepas hipermucoideas.
5. Buscar genes de virulencia en las cepas hipermucoideas.
6. Enfocar futuros estudios a la recolección de cepas aisladas de infecciones adquiridas en la comunidad por su facilidad de presentar fenotipo hipermucoide.

## 12. BIBLIOGRAFIA

- Abdul Rahim, N., Cheah, S. E., Johnson, M. D., Yu, H., Sidjabat, H. E., Boyce, J., Butler, M. S., Cooper, M. A., Fu, J., Paterson, D. L., Nation, R. L., Bergen, P. J., Velkov, T., & Li, J. (2015). Synergistic killing of NDM-producing MDR *Klebsiella pneumoniae* by two 'old' antibiotics-polymyxin B and chloramphenicol. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.*, 70 (9): , 2589–2597.
- Alcántar- Curiel M., Girón J. (2015). *Klebsiella pneumoniae* and the pyogenic liver abscess: implications and association of the presence of *rmpA* genes and expression of hypermucoviscosity. *Virulence*, 6 (5): , 407-409.
- Allegranzi B., Bagheri S., Combescure C., Graafmans W., Attar H., Donaldson L., Pittet D. (2011) Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. *The lancet (London)*, 377 (9761),228-241.
- Ambler R. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* , D289, 321-331.
- Auriti, C., Maccallini, A., Di Liso, G., Di Ciommo, V., Ronchetti, M. P., & Orzalesi, M. (2003). Risk factors for nosocomial infections in a neonatal intensive-care unit. *The Journal of hospital infection*, 53(1), 25–30.
- Babini G., Livermore D. (2000). Are SHV betalactamases Universal in *Klebsiella pneumoniae*?. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (8), 2230.
- Banco Mundial. (2017) *Drug-resistant infections: A threat to our economic future*.<https://documents.worldbank.org/en/publication/documents-reports/documentdetail/323311493396993758/final-report>
- Banerjee, T., Bhattacharjee, A., Upadhyay, S., Mishra, S., Tiwari, K., Anupurba, S., Sen, M. R., Basu, S., & Kumar, A. (2016). Long-term outbreak of *Klebsiella pneumoniae* & third generation cephalosporin use in a neonatal intensive care unit in north India. *The Indian journal of medical research*, 144(4), 622–629.
- Bengoechea J., Sa Pessoa J. (2019). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews*, 43 (2), 123–144.

- Boyle F., Morris D., O'connor J., Delappe N., Ward J., Cormican M. (2010). First report of extended spectrum betalactamase producing *Salmonella entérica serovar Kentucky* isolated from poultry in Ireland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 , 551-553.
- Brisse S., Grimont F. y Grimont P. (2006). The genus *Klebsiella*. En: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer KH., Stackebrandt E. (Eds). *The prokaryotes* (159-196) New York, NY: Springer.
- Broberg C., Palacios M., Miller V. (2014). *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000 Prime Reports*, 6 (64), 2-12.
- Bush K., Jacoby G. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 ,969-976.
- Calfee D. (2017). Recent advances in the understanding and management of *Klebsiella pneumoniae*. *F100 Research*, 6 (5), 1-9.
- Catalan J., Garza U., Parres H. (2017). Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella spp.* phenotypes?. *Virulence*, 8 (7), 1111-1123.
- Cavaco L., Pasmán H., Xia S., Aarestrup F. (2009). A novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella entérica serovar Kentucky* and *Bovismorvificans* strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 603-608.
- Chetcuti S., Azzopardi N., Sant J. (2014). Mortality risk score for *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *European Journal of Internal Medicine*, 25, 571-576.
- Chung The, H., Karkey, A., Pham Thanh, D., Boinett, C. J., Cain, A. K., Ellington, M., Baker, K. S., Dongol, S., Thompson, C., Harris, S. R., Jombart, T., Le Thi Phuong, T., Tran Do Hoang, N., Ha Thanh, T., Shretha, S., Joshi, S., Basnyat, B., Thwaites, G., Thomson, N. R., Rabaa, M. A., ... Baker, S. (2015). A high-resolution genomic analysis of multidrug-resistant hospital outbreaks of *Klebsiella pneumoniae*. *EMBO molecular medicine*, 7(3), 227–239.
- Darby A., Lertpiriyapong K., Sarkar U., Seneviratne U., Park S., Gamazon R., Batchelder C., Cheung C., Buckley M., Taylor S., Shen Z., Tannenbaum R.,

- Wishnok S., Fox G. (2014). Cytotoxic and Pathogenic Properties of *Klebsiella oxytoca* Isolated from Laboratory Animals. *Plos One*, 9 (7), e100542.
- Deepa, R., Ravichandran, M., Banu, S. T., & Sharmila, R. (2017). Evaluation of Nordmann, Dortet, and Poirel test for the identification of extended spectrum betalactamase production among urinary isolates of *Escherichia coli*. *Journal of laboratory physicians*, 9(4), 269–272. [https://doi.org/10.4103/JLP.JLP\\_154\\_16](https://doi.org/10.4103/JLP.JLP_154_16)
- Dehshiri, M., Khoramrooz, S. S., Zoladl, M., Khosravani, S. A., Parhizgari, N., Motazedian, M. H., Jahedi, S., & Sharifi, A. (2018). The frequency of *Klebsiella pneumoniae* encoding genes for CTX-M, TEM-1 and SHV-1 extended-spectrum beta lactamases enzymes isolated from urinary tract infection. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 17(1), 4.
- Denkovskienė E., Paškevičius Š., Misiūnas A., Stočkūnaitė B., Starkevič U., Vitkauskienė A., Hahn-Löbmann S., Schulz S., Giritch A., Gleba Y., Ražanskienė A. (2019). Broad and Efficient Control of *Klebsiella* Pathogens by Peptidoglycan-Degrading and Pore-Forming Bacteriocins Klebicins. *Scientific Reports*, 9 (15422), 1-11.
- Dortet, L., Cuzon, G., Ponties, V., & Nordmann, P. (2017). Trends in carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, France, 2012 to 2014. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 22(6), 30461.
- European Center for Disease Prevention and Control. (2018). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2018>
- Fabbri, G., Panico, M., Dallolio, L., Suzzi, R., Ciccia, M., Sandri, F., & Farruggia, P. (2013). Outbreak of ampicillin/piperacillin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit (NICU): investigation and control measures. *International journal of environmental research and public health*, 10(3), 808–815.

- Fabrega A., Merle L., Boguéneq C., Jimenez M., Vila J. (2009). Repression of invasion genes and decreased invasion in a high level fluoroquinolone resistant *Salmonella typhimurium* mutant. *PLoS ONE*, 4 (11), E8029.
- Fang C., Chuang Y., Shun T., Chang S., Wang J. (2004). A novel Virulence Gene in *Klebsiella* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. *Journal of Experimental Medicine*, 199 (5), 697-705.
- Fazili T., Sharngoe C., Endy T., Kiska D., Javaid W., Polhemus M. (2016). *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: an emerging disease. *American Journal of the Medical Sciences*, 351 (3), 297-304.
- García J., Martínez D., Caña L., González D., Rodríguez L., Rodolfo H., De Donato M., Guzmán M. (2018). Genes *qnr* en *Enterobacteriaceae* aisladas en un hospital de Venezuela. *Revista Chilena de Infectología*, 147-154.
- Garza-González E., Morfín-Otero R., Mendoza-Olazarán S., Bocanegra-Ibarias P., Flores-Treviño S., Rodríguez-Noriega E., Ponce-de-León A., Sanchez-Francia D., Franco-Cendejas R., Arroyo-Escalante S., Velázquez-Acosta C., Rojas-Larios F., Quintanilla J., Maldonado-Anicacio Y., Martínez-Miranda R., Ostos-Cantú L., Gomez-Choel A., Jaime-Sanchez L., Avilés K.,(...), Camacho-Ortiz A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *Plos One*, 14 (3), e0209865.
- Garza-Ramos U., Barrios-Camacho H., Moreno-Domínguez S., Toribio-Jiménez J., Jardón-Pineda D., Cuevas-Peña J., Sánchez-Bedolla A., Olgúin-Rodríguez J., Román-Román A. (2018). Phenotypic and molecular characterization of *Klebsiella* spp. isolates causing community-acquired infections. *New Microbes and New Infections*, 23 , 17-27.
- Grünbaum Blanch F. (2011) Resistencia a aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae*. *Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Barcelona*.
- Guo, Y., Wang, S., Zhan, L., Jin, Y., Duan, J., Hao, Z., Lv, J., Qi, X., Chen, L., Kreiswirth, B. N., Wang, L., & Yu, F. (2017). Microbiological and Clinical Characteristics of Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* Isolates Associated with Invasive Infections in China. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 24.

- Haller, S., Eller, C., Hermes, J., Kaase, M., Steglich, M., Radonić, A., Dabrowski, P. W., Nitsche, A., Pfeifer, Y., Werner, G., Wunderle, W., Velasco, E., Abu Sin, M., Eckmanns, T., & Nübel, U. (2015). What caused the outbreak of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit, Germany 2009 to 2012? Reconstructing transmission with epidemiological analysis and whole-genome sequencing. *BMJ open*, 5(5), e007397.
- Herruzo, R., Ruiz, G., Gallego, S., Diez, J., Sarria, A., & Omeñaca, F. (2017). VIM-*Klebsiella oxytoca* outbreak in a Neonatal Intensive Care Unit. This time it wasn't the drain. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 58(4), E302–E307.
- Herzog K., Schneditz G., Leitner E., Feiert G., Hoffmann K., Zollner- Schwetz I., Krauze R., Gorkiewics G., Zechne L., Hogenauer C. (2014). Genotypes of *Klebsiella oxytoca* Isolates from Patients with Nosocomial Pneumonia Are Distinct from Those of Isolates from Patients with Antibiotic-Associated Hemorrhagic Colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 52 (5): 1607-1616.
- Imai, K., Ishibashi, N., Kodana, M., Tarumoto, N., Sakai, J., Kawamura, T., Takeuchi, S., Taji, Y., Ebihara, Y., Ikebuchi, K., Murakami, T., Maeda, T., Mitsutake, K., & Maesaki, S. (2019). Clinical characteristics in blood stream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*: a comparative study, Japan, 2014-2017. *BMC infectious diseases*, 19(1), 946.
- Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. (2019) *No podemos esperar: Asegurar el futuro contra las infecciones farmacorresistentes*. [https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG\\_final\\_report\\_ES.pdf?ua=1](https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_ES.pdf?ua=1).
- Iredell J., Brown J., Tagg K. (2016). Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*: mecanismos and clinical implications. *British Medical Journal*, 352 , H6420.
- Kazmierczak, K. M., Rabine, S., Hackel, M., McLaughlin, R. E., Biedenbach, D. J., Bouchillon, S. K., Sahm, D. F., & Bradford, P. A. (2015). Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(2), 1067–1078.

- Krause M., Serio W., Kane R., Connolly E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6 (6), a027029.
- Laupland K., Ross T., Pitout J., Church D., Gregson D. (2007). Community-onset urinary tract infections: a population-based assessment. *Infection*, 35, 150-153.
- Lee C., Lee J., Seung K., Jeon J., Kim Y., Cha C., Chul B., Hee S. (2017). Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence- Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (483), 1-13.
- Li B., Zhao Y., Liu C., Chen Z., Zhou D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, 9 (9), 1071-1081.
- Liakopoulos, A., Mevius, D., & Ceccarelli, D. (2016). A Review of SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Frontiers in microbiology*, 7, 1374.
- Lorente J., Placer J., Salvado M., Segura C., Gelabert-Mas A. (2005) Antibiotic resistance transformation in community-acquired urinary infections. *Revista Clinica Española*, 205, 259-264
- Magill S., Edwards J., Bamberg W., Beldavs Z., Dumyati G., Kainer M., Fridkin S. (2014). Multistate point-Prevalence Survey of Health Care-Associated Infections. *New England Journal of Medicine*, 370 (13), 1198-1208.
- Masi, M., Winterhalter, M. y Pagès, JM (2019). Porinas de la membrana externa. En *Membranas y paredes de células bacterianas* (págs. 79-123). Springer, Cham.
- Matsumura, Y., Peirano, G., Devinney, R., Bradford, P. A., Motyl, M. R., Adams, M. D., Chen, L., Kreiswirth, B., & Pitout, J. (2017). Genomic epidemiology of global VIM-producing *Enterobacteriaceae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(8), 2249–2258.
- Mazzariol, A., Bazaj, A., & Cornaglia, G. (2017). Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *Journal of chemotherapy* (Florence, Italy), 29(sup1), 2–9. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2017.1380395>

- Medina Landaeta A. (2011). Resistencia antimicrobiana en aislados de *Escherichia coli* de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina. *Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid*.
- Montgomery, A. B., Rhomberg, P. R., Abuan, T., Walters, K. A., & Flamm, R. K. (2014). Potentiation effects of amikacin and fosfomicin against selected amikacin-nonsusceptible Gram-negative respiratory tract pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 58(7), 3714–3719.
- Moradigaravand D., Martin V., Peacock J., Parkhill J. (2017). Population Structure of Multidrug-Resistant *Klebsiella oxytoca* within Hospitals across the United Kingdom and Ireland Identifies Sharing of Virulence and Resistance Genes with *K. pneumoniae*. *Genome Biology and Evolution*, 1-11.
- Morfin-Otero, R., Rodriguez-Noriega, E., Deshpande, L. M., Sader, H. S., & Castanheira, M. (2009). Dissemination of a bla(VIM-2)-carrying integron among *Enterobacteriaceae* species in Mexico: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 15(1), 33–35.
- Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging infectious diseases*, 17(10), 1791–1798.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/es/>.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Reunión de las Naciones Unidas sobre la Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/bulletin/volumes/94/9/16-020916/es/>
- Paczosa M., Mecsas J. (2016) *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 (3), 629-661.
- Palzkill T. (2018). Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC  $\beta$ -lactamases. *Frontiers in molecular biosciences*, 5, 16.

- Philippon A., Arlet L. (1994). Origin and impact of plasmid mediated extended-spectrum beta-lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases*, 1, 17-29.
- Pitout, J. D., Nordmann, P., & Poirel, L. (2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(10), 5873–5884.
- Podschun R., Ullman U. (1998). *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Review*, 11(4), 589-603.
- Pomakova, D. K., Hsiao, C. B., Beanan, J. M., Olson, R., MacDonald, U., Keynan, Y., & Russo, T. A. (2012). Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 31(6), 981–989.
- Quiñones D. (2017). Resistencia Antimicrobiana: Evolución y perspectivas actuales ante el enfoque “Una salud”. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69 (3), 1-17.
- Rebekah M. y Michael B. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8 (4), 1-15.
- Robicsek A., Jacoby A., Hooper C. (2006). The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infection Diseases*, 6 , 629-640.
- Rodríguez M. (2018). *Frecuencia de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud en los principales sistemas de información en México*. CONAMED-OPS. [http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin17/frecuencia\\_infecciones.pdf](http://www.conamed.gob.mx/gobmx/boletin/pdf/boletin17/frecuencia_infecciones.pdf).
- Rodríguez-Baño, J., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Machuca, I., & Pascual, A. (2018). Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical microbiology reviews*, 31(2), e00079-17.

Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología. (2017). *Informe Anual 2015, Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica RHOVE*. <https://www.gob.mx/salud/documentos/informes-rhove-2015>

Senard, O., Bouchand, F., Deconinck, L., Matt, M., Fellous, L., Rottman, M., Perronne, C., Dinh, A., & Davido, B. (2018). Efficacy of cefoxitin for the treatment of urinary tract infection due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Therapeutic advances in infectious disease*, 6, 2049936118811053.

Shon A., Bajwa R., Russo T. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* a new and dangerous breed. *Virulence*, 4 (2), 107-118.

Struve C., Roe C., Stegger M., Stahlhut S., Hansen D., Engelthaler D., Anderson P., Driebe E., Keim P., Krobfelt K. (2015). Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mBIO*, 6 (4), 615-630.

Tamma, P. D., Doi, Y., Bonomo, R. A., Johnson, J. K., Simner, P. J., & Antibacterial Resistance Leadership Group (2019). A Primer on AmpC  $\beta$ -Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 69(8), 1446–1455.

Tesis de Abraham

Tesis Ortega

Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019).  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of molecular biology*, 431(18), 3472–3500.

Tzouveleki, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T., & Daikos, G. L. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clinical microbiology reviews*, 25(4), 682–707.

Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?. *Clinical microbiology reviews*, 18(2), 306–325.

Zhang Y., Zhao C., Wang Q., Wang X., Chen H., Li H., Zhang F., Li S., Wang R., Wang H. (2016). High Prevalence of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Infection in China: Geographic Distribution, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 60 (10), 6115-6120.

Zhang, J., Zhou, K., Zheng, B., Zhao, L., Shen, P., Ji, J., Wei, Z., Li, L., Zhou, J., & Xiao, Y. (2016). High Prevalence of ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Causing Community-Onset Infections in China. *Frontiers in microbiology*, 7, 1830.

### 13. ANEXOS

#### 13.1. Datos principales de las cepas trabajadas en este estudio

Datos de las cepas que se seleccionaron del Hospital I.S.S.S.T.E. para el estudio.

Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Puebla							
Paciente	Género	Edad	Fecha de aislamiento	Servicio Hospitalario	Muestra	Especie	Clave de cepario
1	Femenino	78 años	04/02/2016	Medicina Familiar	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE1
2	Femenino	40 días	29/03/2016	UTTP	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE3
3	Femenino	51 años	14/04/2016	N/E	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE4
4	Masculino	Neonato	15/06/2016	PEDH	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE5
		Neonato	21/06/2016	PEDH	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE6
		Neonato	N/E	PEDH	Punta de catéter venoso central	<i>K. pneumoniae</i>	KpE7
5	Masculino	59 años	05/07/2017	MIH	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE8
6	Masculino	Neonato	N/E	UCI Neonatal	Urocultivo	<i>K. oxytoca</i>	KpE9
7	Femenino	51 años	04/10/2017	Nefrología	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE10
8	Femenino	50 años	06/10/2017	MIH	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE11
9	Masculino	N/E	N/E	N/E	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE12
10	Femenino	64 días	18/10/2017	MIH	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE14
11	Femenino	72 años	28/10/2017	UCI	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE15
12	Masculino	53 años	26/10/2017	UROC	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE16
13	Femenino	79 años	03/11/2017	MIH	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE19
14	Femenino	65 años	N/E	Nefrología	Lavado Bronco-Alveolar	<i>K. pneumoniae</i>	KpE22
15	Masculino	63 años	28/11/2017	UROC	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE23
		62 años	N/E	Nefrología	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE25
16	Masculino	Neonato	N/E	PEDH	Punta de catéter venoso central	<i>K. pneumoniae</i>	KpE26
17	Femenino	55 años	N/E	MIH	Expectoración	<i>K. pneumoniae</i>	KpE28
18	Masculino	62 años	04/01/2018	CIRH	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE31
19	Femenino	80 años	09/01/2018	CIRH	Herida	<i>K. pneumoniae</i>	KpE32
20	Masculino	67 años	08/01/2018	UCI	Lavado Bronco-Alveolar	<i>K. pneumoniae</i>	KpE33
21	Femenino	54 años	N/E	MIH	N/E	<i>K. oxytoca</i>	KpE37
22	Masculino	23 años	N/E	MIH	Expectoración	<i>K. pneumoniae</i>	KpE38
23	Femenino	Neonata	N/E	UCIN	Hemocultivo Central Aerobio	<i>K. pneumoniae</i>	KpE39
		41 días	03/05/2018	UCIN	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE42

24	Masculino	Neonato	N/E	Pediatría	Cultivo de material	<i>K. pneumoniae</i>	KpE40
25	Femenino	46 años	04/04/2018	Ginecología	Exudado vaginal	<i>K. pneumoniae</i>	KpE41
26	Femenino	59 años	N/E	CIRH	Cultivo de líquido pleural	<i>K. pneumoniae</i>	KpE44
27	Femenino	26 años	N/E	Nefrología	Cultivo de secreción	<i>K. pneumoniae</i>	KpE45
		26 años	N/E	DPCA	Cultivo de secreción	<i>K. pneumoniae</i>	KpE52
28	Masculino	71 años	N/E	MIH	Lavado Bronco-Alveolar	<i>K. pneumoniae</i>	KpE46
		71 años	N/E	MIH	Lavado Bronco-Alveolar	<i>K. pneumoniae</i>	KpE49
		71 años	N/E	MIH	Hemocultivo Periférico	<i>K. pneumoniae</i>	KpE50
29	Masculino	63 años	25/05/2018	MIH	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE47
30	Masculino	3 meses	28/05/2018	PEDC	Urocultivo	<i>K. oxytoca</i>	KpE51
31	Femenino	83 años	07/06/2018	MF	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE54
32	Masculino	63 años	07/06/2018	Nefrología	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE55
33	Femenino	36 años	18/06/2018	UROC	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE56
34	Masculino	48 años	N/E	MIH	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE58
35	Masculino	79 años	03/07/2018	MIH	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE59
		79 años	N/E	MIH	Hemocultivo periférico	<i>K. pneumoniae</i>	KpE60
36	Masculino	60 años	N/E	Nefrología	Exudado nasal	<i>K. pneumoniae</i>	KpE62
37	Femenino	68 años	24/07/2018	cirugía	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE64
		68 años	N/E	cirugía	Hemocultivo Central Aerobio	<i>K. pneumoniae</i>	KpE67
38	Femenino	Neonata	N/E	UCIN	Lavado Bronco-Alveolar	<i>K. pneumoniae</i>	KpE66
39	Masculino	Neonato	N/E	UCIN	Hemocultivo Central Aerobio	<i>K. pneumoniae</i>	KpE68
40	Masculino	Neonato	N/E	UCIN	Cultivo de Secreción	<i>K. pneumoniae</i>	KpE69
		Neonato	16/10/2018	PEDH	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE76
		Neonato	16/10/2018	PEDH	Punta de catéter	<i>K. pneumoniae</i>	KpE77
		Neonato	14/11/2018	PEDH	Lavado Bronco-Alveolar	<i>K. pneumoniae</i>	KpE81
41	Femenino	76 años	N/E	MIH	N/E	<i>K. pneumoniae</i>	KpE70
42	Femenino	67 años	16/08/2018	Nefrología	Urocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpE72
43	Masculino	63 años	N/E	cirugía	N/E	<i>K. oxytoca</i>	KpE73
44	Femenino	55 años	13/09/2018	MIH	Lavado Bronco-Alveolar	<i>K. pneumoniae</i>	KpE74
45	Femenino	50 años	N/E	CIRH	Hemocultivo Central Aerobio	<i>K. pneumoniae</i>	KpE75
46	Masculino	30 años	16/10/2018	UCI	Lavado Bronco-Alveolar	<i>K. pneumoniae</i>	KpE78
47	Masculino	64 años	N/E	ONCOC	Cultivo de secreción	<i>K. pneumoniae</i>	KpE79
48	Femenino	Neonato	31/10/2018	PEDH	Hemocultivos	<i>K. pneumoniae</i>	KpE80

Datos de las cepas que se seleccionaron del Hospital I.S.S.S.T.E.P. para el estudio

I.S.S.S.T.E.P.							
Paciente	Género	Edad	Fecha de aislamiento	Servicio Hospitalario	Muestra	Especie	Clave de cepario
1	Masculino	47	03/03/2018	Geriatría	Cultivo de secreción	<i>K. pneumoniae</i>	KpP1
2	Masculino	71	N/E	Geriatría	Cultivo de sonda Foley	<i>K. pneumoniae</i>	KpP2
3	Masculino	60	08/08/2018	Cirugía General	Cultivo de secreción	<i>K. pneumoniae</i>	KpP3

Datos de las cepas que se seleccionaron del Hospital General Regional No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla para el estudio.

Hospital General No. 72 I.M.S.S. Tlalnepantla							
Paciente	Género	Edad	Fecha de aislamiento	Servicio Hospitalario	Muestra	Especie	Clave de cepario
1	Femenino	Neonata	26/12/2018	Pediatría	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpS1
2	Femenino	Neonata	28/12/2018	Pediatría	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpS2
		Neonata	04/01/2019	Pediatría	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpS5
3	Femenino	Neonata	02/01/2019	Pediatría	Hemocultivo	<i>K. pneumoniae</i>	KpS3
4	Masculino	Neonato	02/01/2019	Pediatría	Hemocultivo	<i>K. oxytoca</i>	KpS4
5	Masculino	Neonato	10/01/2019	Pediatría	Hemocultivo	<i>K. oxytoca</i>	KpS6

Datos de las cepas que se seleccionaron del Hospital para el Niño Poblano para el estudio.

Hospital para el Niño Poblano							
Paciente	Género	Edad	Fecha de aislamiento	Servicio Hospitalario	Muestra	Especie	Clave de cepario
1	Femenino	15 años	30/07/2014	N/E	Líquido pleural	<i>K. pneumoniae</i>	KpN24
2	Masculino	16 años	17/06/2015	N/E	Líquido pleural	<i>K. pneumoniae</i>	KpN29
3	Femenino	4 años	30/12/2015	N/E	Tumor rabdoide	<i>K. pneumoniae</i>	KpN39

Datos de las cepas que se seleccionaron del Laboratorio Clínico Especializado “Los Ángeles” de la ciudad de Puebla para el estudio.

Laboratorio clínico Especializado “Los Ángeles”							
Paciente	Género	Edad	Fecha de aislamiento	Servicio Hospitalario	Muestra	Especie	Clave de cepario
1	Femenino	1 año	ago-18	Privado	Faringe	<i>K. pneumoniae</i>	KpLC9
2	Femenino	34 años	ago-18	Privado	Faringe	<i>K. pneumoniae</i>	KpLC10
3	Masculino	38 años	oct-18	Privado	Faringeo	<i>K. pneumoniae</i>	KpLC19