



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

Licenciatura en Biomedicina

Eje de Microbiología

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA A QUINOLONAS Y AMINOGLUCÓSIDOS EN CEPAS DE *Klebsiella* spp AISLADAS ANTES Y DURANTE LA PANDEMIA DE SARS- CoV-2.

Tesis para obtener el grado de:

Licenciado en Biomedicina.

Presenta

Isamar Ailen Velázquez Andrade.

Director de tesis

Dra. Patricia Lozano Zaraín. 

Puebla, Pue. Febrero, 2025

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**, por el acceso a las oportunidades de aprendizaje y crecimiento a lo largo de mi trayectoria universitaria.

A la **Facultad de Medicina y la Licenciatura en Biomedicina**, por brindarme el espacio y las herramientas para crecer profesionalmente, por permitirme aprender, crecer y descubrir el camino de la ciencia.

Al **laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad**, del centro de investigación en ciencias microbiológicas, por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo de tesis en sus instalaciones, bajo la dirección de la **D.C. Patricia Lozano Zaráin**. Agradezco profundamente por permitirme ser parte de este espacio, donde conocí a grandes personas que enriquecieron mi formación. Más allá de las experiencias académicas, encontré un ambiente de compañerismo que enriqueció tanto mi formación profesional como personal. Gracias por enseñarme tanto.

A la **Vicerrectoría de Investigación y Estudio de Posgrado**, por el apoyo y facilidades brindadas que permitieron realizar este proyecto y recibir una beca durante la participación en el proyecto (**100031833-VIEP2022**)

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)**, por su valiosa contribución.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la **D.C Patricia Lozano Zarain**, por permitirme ser parte de sus alumnos y por guiarme en todo este proceso, por todo el apoyo me ha brindado, por alentarme a seguir adelante, por su atención, por su valioso tiempo, y por ser una gran fuente de inspiración, tanto en lo académico como en lo personal. Gracias por la bonita comunidad que han creado dentro del laboratorio, y por enseñarnos los valores esenciales que debemos aplicar tanto en la ciencia como en nuestra vida profesional. Gracias por compartir conmigo sus conocimientos, pero sobre todo por la confianza que deposito en mí, por su paciencia y su cariño para lograr este trabajo.

A la **D. C Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por todo el apoyo y la atención brindada dentro del laboratorio, por su valioso tiempo a la revisión de este trabajo, por su orientación y el conocimiento compartido.

Al **D.C. Alejandro Carabarin**, por su tiempo y la atención brindada para la revisión de este trabajo, por sus comentarios y sugerencias, además de sus valiosos conocimientos compartidos en algunas clases, gracias.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A **Dios**, presente en cada suspiro, por su gracia y amor, por demostrarme una y mil veces que él está presente, por guiarme, por ser mi sustente en todo momento, por escucharme, sin el nada sería.

A mis padres, **Margarita** y **Emigdio**, por creer en mí, por su amor incondicional y apoyarme, por escucharme y alentarme, por cada consejo, por cada oración y porque siempre me han dado ánimos para seguir este camino, por cada esfuerzo y sacrificio que hacen para nosotros. Me quedo corta al agradecer todo lo que hacen por mis hermanos y por mí.

A mis hermanos, **Emi** y **Edwin**, por su amor apache, gracias por soportarme siempre que ando de malas, por escucharme y acompañarme en este proceso.

A mi querida mamá **Ali**, por el amor que nos brinda, por interesarse por mi día a día, por ser una mujer ejemplar, por su fe inquebrantable y su resiliencia que tanto admiro, gracias por tanto.

A mis tíos **Paco**, **Luisa** y **Queta**, por estar siempre pendiente de mí, por su amor, sus consejos y por alentarme desde siempre. A mi tía **Cris**, por tus consejos, por tu amor, por tu apoyo y por darme ánimos siempre. Gracias, familia, me siento orgullosa de pertenecer a ustedes y de llevar siempre en mi corazón el amor y los valores que me han enseñado.

A mis abuelitos, Mamá **Raquel**, **Francisco** y **Ma Cati**, quienes comenzaron este camino conmigo y, de una u otra forma, lo han concluido a mi lado. Siempre estarán presentes en mi corazón y mi mente. Gracias por todas sus enseñanzas, su amor incondicional y los hermosos recuerdos que me dejaron, que son ahora mi mayor tesoro. Su ejemplo y cariño me acompañan siempre.

A mis amigos, **Adri**, **Ele**, **Ana**. con quienes he compartido tantos años. Gracias por escucharme, por permitir compartir con ustedes lo que cada día aprendía y por alentarme en cada etapa. A mi Biomeamiga, **karlita**, por las largas platica que iban de un tema a otro, por las comidas, las tareas, por tu amistad y apoyo.

A **Vero**, “mamá” vero, mi mentora. Gracias por compartir conmigo tu conocimiento, por escucharme, por tus consejos y por esos pequeños regaños que siempre me ayudaron a mejorar, agradezco que me hayas enseñado y recibido (obligatoriamente) para formar parte del Team *Klebsiella*, gracias por enseñarme más allá de la ciencia. A **Elsy**, por permitirme aprender de ti, por ser mi compañera para las memelas, por las largas horas y los días que nos tocaba acompañarnos en mis últimos meses en el lab. A **Cristy**, por las enseñanzas y tiempo que dedico para resolver mis dudas.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de microbiología hospitalaria y de la comunidad: **Laura**, **Diego**, **Pablo**, **Cruz**, **Diana**, **Lore**, **Brenda** y **Toño**, por las pláticas, la ayuda en los experimentos, por compartir no solo conocimientos, si no también temas variados, pero siempre tenían algo que contar. Gracias por todos los momentos.

Índice

RESUMEN -----	8
1. INTRODUCCIÓN -----	9
• CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>KLEBSIELLA</i> SPP.-----	9
• RESISTENCIA ANTIBACTERIANA UN PROBLEMA A NIVEL MUNDIAL -----	10
• MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN <i>K. PNEUMONIAE</i> -----	10
• MECANISMO DE RESISTENCIA A AMINOGLUCÓSIDOS -----	12
• MECANISMOS DE RESISTENCIA A QUINOLONAS-----	13
2. ANTECEDENTES -----	14
2.2 ANTECEDENTES GENERALES -----	14
2.3 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS-----	16
3. JUSTIFICACIÓN -----	17
4. HIPÓTESIS CIENTÍFICA -----	19
5. OBJETIVOS -----	19
5.2 OBJETIVO GENERAL-----	19
5.3 OBJETIVOS PARTICULARES-----	19
MATERIAL Y MÉTODOS -----	20
5.4 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS -----	21
RESULTADOS -----	31
PERSPECTIVAS -----	58
BIBLIOGRAFÍA. -----	59
ANEXOS -----	70

Índice de figuras

Figura 1 . Principales mecanismos de Resistencia.....	12
Figura 2. Posición de discos de antibiótico.	23
Figura 3 Detección de los genes aac(6')-Ib (482 pb), aac(3)-II (237 pb).....	40
Figura 4. Detección de los genes de resistencia qnrA (580 pb) y qnrB (264 pb)	43
Figura 5. Dendograma UPGMA y PFGE de los patrones de restricción obtenidos de la digestión con la enzima Xba1, de 29 cepas de K. pneumoniae del Hospital para el Niño Poblano.	46

Índice de tablas

Tabla 1. Fundamento de las pruebas bioquímicas.	22
Tabla 2. Antibióticos y valores de referencia utilizados para interpretación de antibiogramas.	24
Tabla 3. Antibióticos por evaluar en la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria	25
Tabla 4. Antibióticos y puntos de corte de acuerdo con el CLSI 2023 para interpretación de Concentración Mínima inhibitoria.	26
Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la amplificación de los distintos genes que determinan resistencia a quinolonas y aminoglucósidos.	27
Tabla 6. Elementos y cantidades utilizadas para las reacciones de PCR.	28
Tabla 7. Cepas control utilizadas para la amplificación de los genes de interés.....	29
Tabla 8. Condiciones del corrimiento electroforético de la PFGE-Xba1.....	31
Tabla 9. Resultados representativos de las pruebas bioquímicas en cepas de Klebsiella spp.	33
Tabla 10. Perfil de resistencia de las cepas de K. oxytoca del hospital para el Niño Poblano.	35
Tabla 11. Concentración Mínima inhibitoria de amikacina, norfloxacin y ciprofloxacino en cepas de K. pneumoniae el Hospital para el Niño Poblano y Hospital regional I.S.S.S.T.E de Puebla.	38

Índice de graficas

Gráfica 1. Principales servicios hospitalarios de aislamiento de las cepas de Klebsiella spp. aisladas del Hospital para el Niño Poblano (n=32).	32
Gráfica 2. Porcentaje de cepas de Klebsiella spp. por origen de la muestra (n=32).....	32
Gráfica 3. Perfil fenotipo de resistencia de las 30 cepas de K. pneumoniae.....	34
Gráfica 4. Fenotipo observado en las cepas de K. pneumoniae y oxytoca.	36
Gráfica 5. Presencia del gen de resistencia aac(6')-Ib en las cepas de K. pneumoniae y K. oxytoca.	40
Gráfica 6. Presencia del gen de resistencia aac(3)-II en las cepas de K. pneumoniae y K. oxytoca....	41
Gráfica 7. Número de cepas de K.pneumoniae y K. oxytoca positivas para el gen aac(6')-Ib agrupadas por hospital.	42
Gráfica 8. Número de cepas de K. pneumoniae y K. oxytoca positivas a aac(3)-II.....	42
Gráfica 9. Número de cepas de K. pneumoniae y K. oxytoca positivas al gen de resistencia qnrB). ...	44
Gráfica 10. Número de cepas de K. pneumoniae y K. oxytoca positivas a qnrB.	45

Abreviaturas

BLEE	Betalactamasa de Espectro Extendido.
AmpC	Betalactamasa tipo Ampicilinas C
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria.
PFGE	Electroforesis en gel de campos pulsados (Pulsed field gel electrophoresis).
OMS	Organización Mundial de la salud.
MDR	Multidrogo Resistente.
IAAS	Infecciones asociadas a la atención de la salud.
RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica.
TSI	Agar Hierro Triple azúcar
LIA	Agar Hierro lisina
MIO	Agar Movilidad indol ornitina
VP	Vogges Proskauer.
RM	Rojo de metilo.
PCR	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica.
HNP	Hospital del niño poblano.
GM	Gentamicina.
AN	Amikacina.
SXT	Trimetoprim con Sulfametaxazol
Te	Tetraciclina.
C/ CL	Cloranfenicol.
IMP	Imipenem.
NOR	Norfloxacino.
LVX	Levofloxacino.
TIM	Ticarcilina con ácido clavulánico
MEM	Meropenem.
CIP	Ciprofloxacino.
FEP	Cefepime
CRO	Ceftriaxona
FOX	Cefoxitina
CAZ	Ceftazdima
AMC	Amoxicilina con ácido clavulánico
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute.
XDR	Extremodrogo-resistentes
PDR	Pandrogo resistente.
SSI	Solución salina isotónica.
NaCl	Cloruro de sodio.
TSA	Agar Triptona-Soja.
µl	Microlitros.
ng	Nanogramos.
Pb	Pares de bases.
TAE	Buffer Tris-Acetato-EDTA
TE	Buffer Tis-EDTA.

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA.

Resumen

La resistencia antibacteriana en *Klebsiella* spp. es un problema global, con una incidencia en las infecciones asociadas a la atención de la salud, además, su capacidad para diseminarse en entornos hospitalarios y su capacidad para adquirir genes ha resultado en un notable incremento de resistencia a diversos antibióticos. Los aminoglucósidos y quinolonas son dos clases importantes de antibióticos utilizados después de los β -lactámicos para tratar infecciones causadas por bacterias Gram-negativas, como *Klebsiella* spp., tanto en entornos hospitalarios como en la comunidad. Se analizaron 55 cepas de *Klebsiella* spp. aisladas de dos hospitales durante los años de pandemia de COVID-19, donde se llevó a cabo la identificación por Vitek2, y posteriormente en nuestro laboratorio una confirmación de género por pruebas bioquímicas, determinación del fenotipo BLEE y/o AmpC, Kirby-Bauer y la determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI). Del mismo modo se hizo la identificación de genes de resistencia por PCR de los genes de resistencia a aminoglucósidos (*aac(3)-II* y *aac(6')-Ib*) y quinolonas (*qnrA* y *qnrB*). Por último, se determinó la relación clonal mediante PFGE-Xba1 en las 29 cepas de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital para el Niño Poblano. Se identificaron 30 cepas de *K. pneumoniae* y 2 cepas de *Klebsiella oxytoca* del Hospital para el Niño Poblano, y 22 cepas de *K. pneumoniae* y 1 cepa de *K. oxytoca* en el Hospital regional I.S.S.S.T.E. Durante la pandemia por COVID-19, se observó un aumento notable en la resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas, principalmente en cepas de *K. pneumoniae*. El 87% de las cepas presentaron un fenotipo de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). La resistencia a quinolonas fue significativa en el 92% de las cepas, observándose una discrepancia entre los métodos de Kirby-Bauer y CMI. En particular, solo el 20.7% de las cepas resistentes con el primer método a amikacina del Hospital para el Niño Poblano mantuvieron concentraciones altas en CMI, entre ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ y > 128 $\mu\text{g/ml}$. En cuanto a la presencia de genes de resistencia, el 93% y 76% de las cepas de *K. pneumoniae* fueron positivas para *aac(3')-II* y *aac(6')-Ib*, respectivamente. Para las cepas de *K. oxytoca* el 100% (3/3) fueron positivas a ambos genes. Mientras que se encontró un alto porcentaje del gen *qnrB* en las cepas resistentes a quinolonas, donde el 83% (43/52) de las cepas fueron positivas para *qnrB*, el gen *qnrA* no se detectó en ninguna cepa analizada. Por último, a través de la técnica de PFGE para determinar la relación clonal, se identificó un grupo con alta similitud genética (KpNP 17 y KpNP 18) presentando un coeficiente de Dice por arriba de 0.85. Este estudio evidencia una alta resistencia en cepas de *Klebsiella* spp. a múltiples antibióticos, con predominio de fenotipos BLEE y genes plasmídicos de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas, lo que puede ser un problema para el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo, por lo que es importante su vigilancia, así como la vigilancia de la *K. oxytoca* encontrada.

Palabras clave: Resistencia antimicrobiana, *Klebsiella* spp, genes de resistencia a aminoglucósidos, quinolonas.

1. Introducción

- Características generales de *Klebsiella* spp.

El género *Klebsiella* se describió por primera vez en el año 1881, por Von Frisch, quien observó bacilos encapsulados a partir de muestras clínicas de pacientes con rinoscleroma. En el año 1885, se designó el género *Klebsiella* en honor al microbiólogo Edwin Klebs (Dong *et al.*, 2022).

Klebsiella spp. pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacterias Gram-negativas, no móviles. Sin embargo, existen reportes donde se han demostrado que algunas cepas de *K. pneumoniae* podrían presentar flagelos polares bajo condiciones específicas, permitiendo así la motilidad de la bacteria (Carabarin Lima Alejandro *et al.*, 2016). *Klebsiella* spp es una bacteria fermentadora de lactosa, anaerobia facultativa, capsulada, miden alrededor de 0.5 a 0.8 μm de diámetro y de 1 a 2 μm de longitud. Además, son organismos saprófitos, los cuales pueden estar presentes en la microbiota oral, piel e intestino de animales y humanos, pueden colonizar plantas y mamíferos e incluso sobrevivir en agua y suelo (Podschun & Ullmann, 1998).

El género *Klebsiella* actualmente consta de 17 especies: *K. pneumoniae* (subespecie *pneumoniae*, subespecie *ozaenae* y subespecie *rhinoscleromatis*), *K. quasipneumoniae* (subespecie *quasipneumoniae* y subespecie *similipneumoniae*), *K. varicola* (subespecie *tropical*), *K. africana*, *K. granulomatis*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *K. grimontii*, *K. pasteurii*, *K. spallanzanii*, *K. huaxiensis*, *K. indica*, *K. electrica*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica*, *K. terrigena*. (<https://psn.dsmz.de/genus/klebsiella>).

Dentro de estas especies, *K. pneumoniae* es la especie más conocida y estudiada, debido a que es una bacteria causante de infecciones nosocomiales oportunistas en los humanos. De las infecciones causadas con mayor frecuencia están: sepsis, neumonía e infecciones urinarias y de tejidos blandos. *Klebsiella* spp se ha convertido en una gran amenaza clínica y de la salud pública, ya que ha demostrado la capacidad de adquirir elementos genéticos móviles como los plásmidos, mediante los cuales logra obtener genes de virulencia y resistencia, haciendo difícil el tratamiento antimicrobiano (Bengoechea & Sa Pessoa, 2018).

Actualmente se conocen dos variantes de la especie *K. pneumoniae*, que generan gran preocupación entre los profesionales de la salud. Las cepas de *K. pneumoniae* clásica (cKp) y la variante hipervirulenta (hvKp). La variante clásica es causante de infecciones con mayor frecuencia en pacientes inmunocomprometidos o frecuentemente expuestos a la atención médica. Entre las manifestaciones clínicas más habituales se encuentra la neumonía e infecciones del tracto urinario, que comúnmente progresan a bacteremia. La variante de *K. pneumoniae* hipervirulenta (hvKp), se reportó por

primera vez en los años 80's y es un patógeno capaz de causar infecciones adquiridas en la comunidad y a menudo en individuos sanos. La infección por esta variante puede progresar a meningitis, endoftalmitis, abscesos en hígado y bazo (Russo & Marr, 2019).

La variante clásica representa un gran desafío para los médicos debido al aumento de las cepas multidrogo resistentes (MDR). Actualmente, las opciones de tratamiento son limitadas y surge la necesidad del uso de antibióticos que se encontraban en desuso. Por otro lado, las cepas de *K. pneumoniae* hipervirulenta han sido en gran medida susceptibles a los antibióticos. Sin embargo, estas cepas se están volviendo altamente resistentes a los antibióticos. Actualmente se tienen cada vez más informes de cepas de *K. pneumoniae* hipervirulentas que causan enfermedades asociadas a la atención de la salud, esto denota una gran preocupación, debido a que puede haber una diseminación de cepas resistentes a los antibióticos capaces de provocar enfermedades invasivas en individuos sanos y el tratamiento en estos casos sería limitado (Bengoechea & Sa Pessoa, 2018).

- Resistencia antibacteriana un problema a nivel mundial

El descubrimiento de la penicilina en el año 1928 fue el punto de partida para el desarrollo de antibióticos de origen microbiano a escala industrial. Desafortunadamente, desde entonces, el uso indiscriminado de estos antibióticos se ha visto acompañado de la rápida aparición de bacterias resistentes (Russell & Houlihan, 2003).

A medida que se avanza en el desarrollo de nuevos antibióticos, las bacterias también evolucionan con el objetivo de resistir los efectos de estos medicamentos. Este proceso implica la adquisición de mecanismos de resistencia y la inducción de mutaciones, lo que da lugar a la aparición de nuevas cepas resistentes, generando un desafío significativo para la eficacia de los tratamientos y creando una seria preocupación para la salud pública a nivel mundial (Habboush & Guzman, 2023).

Por lo tanto, la resistencia antibacteriana es considerada como la pérdida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico al que originalmente era susceptible. La Organización mundial de la salud (OMS) la reconoce como uno de los tres principales problemas importantes de salud humana (OMS, 2019).

- Mecanismos de resistencia a los antibióticos en *K. pneumoniae*

La resistencia a los antibióticos por *K. pneumoniae* es dada por diversos mecanismos, los cuales le pueden conferir resistencia frente a las principales clases de antibióticos: β -lactámicos (incluyendo cefalosporinas y carbapenémicos), aminoglucósidos, fosfomicina y quinolonas (Ferreira *et al.*, 2019).

Los principales mecanismos de resistencia a los antibióticos se presentan en la Figura 1 y son:

1. Inactivación o modificación enzimática del antibiótico: la producción de β -lactamasas, β -lactamasas de espectro extendido (BLEE); (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}), cefalosporinasas (*AmpC*) y carbapenemasas (*bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}), representan las enzimas clave para la resistencia a los antibióticos del grupo de los β -lactámicos, que incluye a las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Estas enzimas tienen la capacidad de realizar la hidrólisis del anillo β -lactámico, característico de los antibióticos β -lactámicos. Este mecanismo de resistencia permite a las bacterias la capacidad de inactivar estos antibióticos, comprometiendo su eficacia (Santajit & Indrawattana, 2016). Por otro lado, la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos, que generalmente se transportan en plásmidos, pueden inactivar a los aminoglucósidos mediante acetilación (acetiltransferasa, AAC), fosforilación a través de fosfotransferasa (APH) o adenilación mediante las nucleotiltransferasas (ANT). Se han descrito variantes de estas enzimas con mutaciones, como el gen *acc-(6')-Ib-cr* que codifica para una enzima modificadora también de las quinolonas, como el ciprofloxacino (Li *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2022) .
2. Alteración del sitio blanco del antibiótico: es un mecanismo que previene la unión o reduce la afinidad del antibiótico. En *K. pneumoniae* esto puede ocurrir a través de mutaciones en el gen que codifica la molécula blanco, cambiando uno o varios aminoácidos de la secuencia o modificando la estructura proteica. Un ejemplo, las mutaciones en las proteínas de unión a penicilina (PBPs), que son el objetivo de los antibióticos β -lactámicos, disminuyendo su eficacia (Moya & Maicas, 2020) . También pueden presentarse mutaciones en los genes que codifican la ADN girasa y la topoisomerasa IV, enzimas diana de las quinolonas, lo que reduce la afinidad del antibiótico. Además, proteínas como las Qnr protegen a la ADN girasa y topoisomerasa IV de la inhibición por quinolonas (Correia *et al.*, 2017). Por otro lado, la activación de proteínas protectoras de los ribosomas (RPPs) altera los sitios de unión ribosómica. este mecanismo incluye la acción de metiltransferasas del ARNr 16S (RMT), codificadas por genes como *armA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* y *rmtF*, que modifican nucleótidos específicos en el ARNr, impidiendo que los aminoglucósidos se unan eficazmente (Doi *et al.*, 2016)
3. Pérdida y/o mutación de porinas:
Provoca la disminución de la entrada de antibiótico, causado por modificaciones en la expresión de porinas en *K. pneumoniae*. OmpK35 y OmpK36 son las principales porinas asociadas con resistencia antibiótica en *K. pneumoniae* y las más estudiadas. Se ha reportado que la pérdida de OmpK35 ha demostrado un aumento en la resistencia a las fluoroquinolonas (ciprofloxacino). Además de estas dos porinas principales, también se han informado de otro tipo de porinas

de membrana externa, como OmpK37, OmpK38, PhoE y OmpK26 (Kaczmarek *et al.*, 2006; Rocker *et al.*, 2020) .

4. Aumento de la expresión de la bomba de expulsión del antibiótico: muchos antibióticos son transportados activamente fuera de la célula mediante bombas de eflujo para disminuir las concentraciones a nivel intracelular y evitar que alcancen sus objetivos blancos. En *K. pneumoniae*, las principales bombas de eflujo son OqxAB y AcrAB, las cuales contribuyen a la resistencia a los antibióticos, favoreciendo la salida de fluoroquinolonas, β -lactámicos, macrólidos (Zhong *et al.*, 2014).

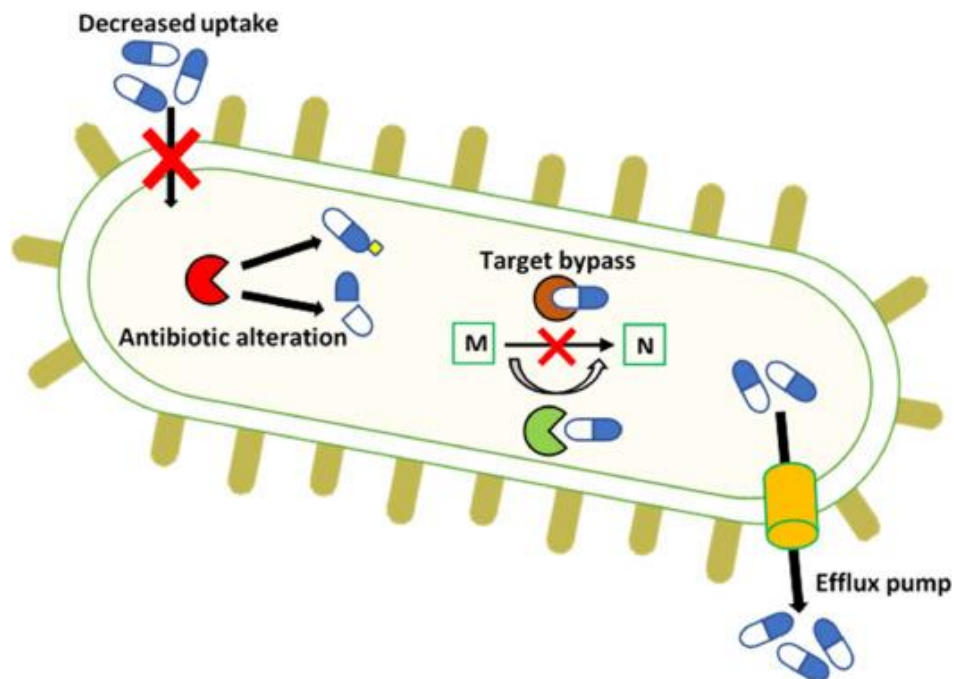


Figura 1 . Principales mecanismos de Resistencia. 1. Inactivación y modificación enzimática del antibiótico, 2. Alteración del sitio blanco del antibiótico conduce a una reducción de la afinidad del fármaco, 3. Pérdida y/o mutación de porinas, 4. Aumento de la expresión de la bomba de expulsión del antibiótico. Tomada de (Pulingam *et al.*, 2022)

- Mecanismo de resistencia a aminoglucósidos

En cuanto a la resistencia a los aminoglucósidos, se han encontrado diferentes mecanismos involucrados en la disminución de la acumulación intracelular del antibiótico: por alteración de la permeabilidad de la membrana interna o salida activa, modificación de la diana por mutaciones en proteínas ribosómicas y la modificación enzimática del fármaco, siendo esta última la más común (Galimand *et al.*, 2003).

El mecanismo de resistencia a aminoglucósidos más común consiste en la producción de enzimas *acetiltransferasas*(AAC), *fosfotransferasas*(APH) y *nucleotidiltransferasas* (ANT) las cuales son modificadoras de aminoglucósidos. Dichas enzimas utilizan cofactores como el ATP o acetil coenzima A, para poder modificar los grupos NH₃ o grupos OH de los antibióticos aminoglucósidos y desactivarlos. Los genes codificantes para las enzimas modificadoras de aminoglucósidos a menudo sufren mutaciones, dando lugar a diversas subclases que contribuyen a la variedad de resistencia a distintos aminoglucósidos e inclusive a quinolonas (Yang & Hu, 2022).

- **Mecanismos de resistencia a quinolonas**

Las fluoroquinolonas son agentes bactericidas de amplio espectro. Su función es inhibir la síntesis del ADN al unirse a la ADN girasa (compuesta por 2 subunidades GyrA y 2 GyrB) y la topoisomerasa IV (compuesta por 2 subunidades ParC y 2 ParE) bacterianas, un complejo enzimático que interviene en la modulación del superenrollamiento cromosómico requerido para la síntesis de ADN, transcripción y división celular (Correia *et al.*, 2017).

El primer mecanismo descrito de resistencia a las quinolonas fue la alteración del sitio diana del antibiótico por mutaciones cromosómicas. La región donde surgen las mutaciones es una pequeña secuencia de ADN conocida como región determinante de la resistencia a las quinolonas (QRDR). Las alteraciones en esta región son resultantes de sustituciones de aminoácidos, que modifican la estructura de la proteína diana, por lo tanto, la afinidad de unión de la fluoroquinolona al sitio, lo que genera la resistencia a esta clase de antibióticos (Hooper & Jacoby, 2015).

Además de las mutaciones en el cromosoma, se han reportado alteraciones que provocan una reducción de la concentración intracelular del antibiótico. Esto puede deberse a una disminución de la captación del antibiótico o por un aumento del flujo de salida, e incluso una combinación de ambos. La disminución de la captación está dada por pérdida o reducción de la expresión de porinas como OmpK35, mientras que el aumento de bombas de eflujo como las AcrAB aumentan el flujo de salida (Fernández & Hancock, 2012; M. Pham *et al.*, 2019).

En el marco de la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, se han identificado mecanismos específicos:

- Genes como *qepA* y *oqxAB*: codifican bombas de eflujo que confieren menor susceptibilidad a las fluoroquinolonas (Bush *et al.*, 2020).
- Gen *qnr* (del inglés *quinole resistance*), codifican proteínas que protegen la ADN girasa de la unión con las quinolonas, actualmente se han descrito cinco familias de este gen: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* y *qnrD* (Fàbrega *et al.*, 2009).
- Gen *aac (6')-Ib-cr*, codifica una enzima aminoglucósido 6'-N-acetiltransferasa que confiere susceptibilidad reducida a la norfloxacin y ciprofloxacina, el gen

es una variante de *aac(6)-Ib* que confiere resistencia a los aminoglucósidos, *aac(6)-Ib-cr*, contiene dos sustituciones de aminoácidos en comparación con el tipo silvestre, lo que le permite acetilar y, posteriormente, reducir la actividad del antibiótico (Abdulkareem *et al.*, 2023).

2. Antecedentes

2.2 Antecedentes generales

Se ha determinado que el problema a la resistencia antibacteriana en *Klebsiella* spp. es un problema a nivel mundial. Esto se ha confirmado a través de trabajos realizados a lo largo del tiempo y en diferentes partes del mundo. En el año 2020 Hu *et al.*, realiza un estudio sobre la resistencia a los carbapenémicos y demuestra que a lo largo de 4 años (2015-2019) hubo un aumento de más del 25%, evidenciando que la carbapenemasa KPC-2 se encuentra presente hasta en un 70% de las cepas. En otro estudio realizado en China por Zhang *et al.*, 2017, donde se analiza aislados de *K. pneumoniae* (155 cepas) y señala que las carbapenemasas están presentes en un 89% de las cepas estudiadas, siendo las más frecuentes KPC-2 (77%) y NDM (23%). Estos resultados destacan que, la resistencia a carbapenémicos está dada principalmente por la producción de enzimas carbapenemasas y refuerza los resultados de la investigación de que KPC-2 es la más frecuentemente encontrada (Zhang *et al.*, 2018).

En el estudio realizado en Egipto por El-Badawy *et al.*, 2017, donde se seleccionan 114 cepas de *Klebsiella* spp., se observa que un porcentaje de ellas presenta resistencia a ciertos antibióticos. Específicamente, el 60% (68/114) de los aislados son resistentes a gentamicina, el 26% (30/114) a amikacina, el 47% (54/114) resistentes a ciprofloxacino y el 43% (49/114) resistentes a levofloxacino. Posteriormente, se realiza la búsqueda de genes y se encuentra que las acetiltransferasas, en particular la variante *acc(6)-Ib*, son el tipo más frecuente de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) presente en un 88 % y la variante *acc(3)-II* en un 58 % en las cepas estudiadas de *Klebsiella* spp. Este estudio destaca cómo un porcentaje significativo de cepas de *Klebsiella* spp., un patógeno común asociado con infecciones hospitalarias y comunitarias es resistente a varios antibióticos. Esto tiene implicaciones para el tratamiento de infecciones y la elección de medicamentos efectivos, además demuestra la alta frecuencia de las enzimas modificadoras acetiltransferasa como mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos, estas enzimas pueden propagarse a través de la transferencia horizontal de genes, lo que significa que las bacterias resistentes pueden transmitir estos genes de resistencia a otras bacterias, incluso entre diferentes especies. Esto contribuye a la rápida propagación de la resistencia a los antibióticos en las comunidades bacterianas, haciendo más difícil el tratamiento de las infecciones (El-Badawy *et al.*, 2017).

En el trabajo de Geetha *et al.*, 2020 se reporta que el gen *acc(6)-Ib-cr* tiene mayor prevalencia (89%), seguido de *qnrB* (12%) y *oqxAb* (6.3%). Este estudio analiza 110 aislados, y el 88% de ellos presenta un alto nivel de MIC (concentración mínima inhibitoria) a ciprofloxacino. Estos hallazgos son consistentes con investigaciones en otros países como Irán, Corea e Israel, donde también se obtuvieron resultados similares en relación con la presencia de estos genes (Geetha *et al.*, 2020).

En México, algunos grupos de investigación realizan y publican estudios sobre prevalencia de la resistencia a antibióticos fenotípica y genotípica en *K. pneumoniae*. El estudio de Sánchez-Álvarez *et al.*, 2022, realizado durante el periodo 2018 al 2020, en cepas de *K. pneumoniae*, demuestra una incidencia notable de resistencia a cefalosporinas en el 30%, y a carbapenémicos en el 2.8% (Sánchez-Álvarez *et al.*, 2022). Esto es preocupante, ya que las cefalosporinas son antibióticos comúnmente utilizados para tratar infecciones bacterianas. En el caso de los carbapenémicos son el tratamiento de último recurso para infecciones graves, por lo que la presencia de resistencia a estos antibióticos es alarmante, debido a la limitación en las opciones de tratamiento efectivo, lo que puede llevar a un aumento en la morbilidad y mortalidad.

Flores-Valdez *et al.*, 2021 realiza un estudio en 38 cepas de *K. pneumoniae* aisladas a partir de hemocultivos de pacientes pediátricos, los resultados revelan datos importantes sobre la resistencia antimicrobiana en diferentes clases de antibióticos, demostrando el problema significativo en México que puede dificultar gravemente las opciones de tratamiento efectivo. En cuanto a la resistencia a las quinolonas, se observa una prevalencia del 97%, además, reporta que el 79% de las cepas presentaban resistencia a los aminoglucósidos. Además, se encuentra una alta predominancia de los genes *oqxA* y *qnrB* (97%), los cuales están asociados con resistencia a las quinolonas. Estos hallazgos coinciden con estudios previos realizados tanto a nivel mundial como en México (Flores-Valdez *et al.*, 2021).

- Impacto de la pandemia de COVID-19 en la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos

En el año 2020, durante la pandemia ocasionada por el SARS-CoV-2, se observa un aumento significativo en el uso de antibióticos, esto debido a la falta de claridad sobre las medidas para contrarrestar los efectos del virus, muchos pacientes con síntomas de COVID-19 recibieron antibióticos como medida profiláctica, a pesar de que el causante es un virus y no responde a los antibióticos. Desafortunadamente, el uso indiscriminado de antibióticos en pacientes con COVID-19 contribuye al problema de la resistencia a los antimicrobianos (AMR) y la aparición de organismos multidrogorresistentes (MDR) (Micheli *et al.*, 2023).

A través del estudio realizado por Giamarellos-Bourboulis *et al.*, 2022 se observa un incremento ligero en la resistencia a múltiples antibióticos en pacientes con COVID-19 en comparación con aquellos sin COVID-19. En el grupo de pacientes con COVID-19

el 46% (25/56) presenta cepas resistentes, mientras que el grupo sin COVID-19 se reporta un 36.6% (157/429). Los genes encontrados en *Klebsiella* spp. en el grupo del 46% son *kpc* y *vim*, mientras en el grupo sin COVID-19 solo se detecta *kpc* (Giannitsioti et al., 2022).

Samaneh Pourajam et al., 2022 analiza 11 agentes antibacterianos en 47 cepas de *K. pneumoniae* recuperadas de adultos con COVID-19 graves, admitidos en dos UCI del 6 de marzo al 7 de septiembre de 2020, de los cuales se observa resistencia en un 97% a los 11 antibacterianos por parte de *K. pneumoniae*, incluso presentando resistencia a colistina con un 10.6% (5/47), este último es un antibiótico utilizado como último recurso para el tratamiento de infecciones bacterianas, esto es preocupante porque limita las opciones de tratamiento para combatir infecciones graves (Pourajam et al., 2022).

En el estudio realizado por Ahmed et al., 2023 se obtienen bacterias Gramnegativas de diferentes muestras clínicas de pacientes con COVID-19, siendo la mayoría de los aislamientos *K. pneumoniae* (89; 40.5%). De estos 89 aislamientos, se encuentran patrones MDR en 51 de ellos (57.3%) , mostrando una alta tasa de resistencia a aminoglucósidos como fueron: amikacina (100%), gentamicina (98%) y tobramicina (98%). Los aislados MDR (51) expresan resistencia (100%) a amoxicilina/ácido clavulánico, ciprofloxacino, cefotaxima, ampicilina, aztreonam y cefuroxima, mientras que la tasa de resistencia a cefepima es del 98%. En el estudio se detectan diversos genes de resistencia a aminoglucósidos, solos o en combinación, siendo *rmtD* el gen más prevalente, seguido de los genes *aac(6)-Ib* y *aph(3)-Ia* (Ahmed et al., 2023).

Este estudio proporciona una visión detallada de la resistencia a aminoglucósidos en *K. pneumoniae* aislada de pacientes con COVID-19. La detección de patrones MDR y genes específicos de resistencia resalta la preocupación por la propagación de cepas resistentes en el contexto de la pandemia. Además, la relación entre la resistencia y la presencia de plásmidos así como la participación de enzimas modificadoras de aminoglucósidos en la eficacia de los fármacos, resaltan la complejidad de este problema (Ahmed et al., 2023).

Con el paso de la pandemia y el incremento en el uso de antibióticos de manera descontrolada y sin prescripción adecuada, de acuerdo a los estudios que hasta el momento se han realizado en diferentes países, es de esperar que en nuestro país los índices de resistencia se hayan elevado, esto puede tener consecuencias en aquellos entornos hospitalarios que ya presentan una alta prevalencia de cepas resistentes a múltiples fármacos, conduciendo a un aumento de la mortalidad debido al limitado conjunto de antibióticos para tratar las infecciones adquiridas en el hospital.

2.3 Antecedentes específicos

En el laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la comunidad se han realizado estudios sobre la resistencia antimicrobiana presentada por *Klebsiella* spp. Pérez–

Sánchez, 2020 presenta un estudio de 75 cepas provenientes de 4 hospitales y de un laboratorio clínico, de las cuales 69 cepas corresponden a *K. pneumoniae* y 6 cepas a *K. oxytoca*. De las cepas de *K. pneumoniae*, el 65.2% (43/69) resulta resistente a cefalosporinas de tercera generación, un dato que subraya la preocupante prevalencia de esta resistencia en el ambiente hospitalario. Además, 63 cepas muestran resistencia fenotípica a aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, tobramicina) y 58 a quinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacino, ácido nalidixico). De las 6 cepas de *K. oxytoca* el 66.66% (4 aislados) presenta resistencia a amikacina, el 83,33% (5 aisladas cepas) a gentamicina y el 100% a tobramicina. A quinolonas el 50% (3 aislados) muestra resistencia a ciprofloxacino y ácido nalidixico, el 16,66 % (1 aislado) a levofloxacino y norfloxacino. Estos porcentajes resaltan la alta incidencia de cepas resistentes a múltiples grupos de antibióticos que comúnmente son utilizados como tratamiento a diferentes infecciones.

Más recientemente, Flores–Percino, 2022, presenta un estudio con 65 cepas de *K. pneumoniae* con fenotipo tanto resistente como sensible a aminoglucósidos y/ o quinolonas, provenientes del estudio de Pérez-Sánchez, y observó que un 96.92% (63/65) presentó resistencia a aminoglucósidos, y de estas, el 80.95% (51/63) portaba el gen *aac(6')-Ib*, mientras el gen *aac(3)-II*, estuvo presente en el 74.6% (47/63).

En cuanto a las quinolonas, el 84.61% (55/65) de las cepas presenta resistencia. Específicamente, el 64.51% (42) es resistente a levofloxacino, el 81,53% (53) a norfloxacino y el 84,61% (55) a ciprofloxacino, ninguna cepa presenta el gen *qnrA*, pero el gen *qnrB* está presente en el 90.9% (50/55), en 5 cepas no se detecta ningún gen de interés, a pesar de mostrar resistencia fenotípicamente a quinolonas, este resultado sugiere la presencia de otros mecanismos de resistencia a quinolonas. De las seis cepas de *K. oxytoca* con resistencia a quinolonas, todas presentan el gen *aac(6')-Ib* y un 50% de ellas también el gen *aac(3)-II*; en ninguna cepa se encuentra el gen *qnrA*, y solo 2 cepas presentan el gen *qnrB*. Los resultados destacan la amplia incidencia de resistencia y la presencia de genes específicos. En este estudio enfatizan la alta presencia de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* en diferentes instituciones de salud (Flores Percino, 2022).

3. Justificación

La habilidad de *Klebsiella* spp para diseminarse en entornos hospitalarios, su propensión a causar infecciones en pacientes inmunocomprometidos y su capacidad para adquirir genes, ha resultado en una notable resistencia a diversos antibióticos. Sin embargo, en relación con la resistencia a aminoglucósidos y quinolonas, no se cuenta con mucha información, especialmente en el contexto de los hospitales de interés.

Esta información es esencial para guiar la selección de tratamientos antimicrobianos adecuados y para implementar estrategias de control de infecciones. Los datos

obtenidos en este trabajo ofrecen una perspectiva sobre la resistencia antibiótica y subrayan la necesidad de abordar este problema con enfoques multidisciplinarios y medidas preventivas.

Con la aparición de la pandemia de COVID-19, el uso de antibacterianos de manera descontrolada o incluso una prescripción sin fundamentos, pudo resultar en una mayor presión selectiva de la resistencia. De acuerdo con los estudios que hasta el momento se han realizado en diferentes países es de esperar que en nuestro país, en el estado de Puebla, la resistencia a ciertos antibióticos haya aumentado.

Al abordar tanto el fenotipo como el genotipo de resistencia, este estudio permitirá comprender mejor sobre las características de resistencia en *Klebsiella* spp. específicamente para aminoglucósidos y quinolonas. Además, la investigación de la relación clonal de las cepas aisladas del Hospital para el Niño Poblano permitirá tener una mejor comprensión de la propagación y diversidad genética en diversos servicios hospitalarios de este centro. Este estudio al final permitirá obtener una explicación de cómo es la distribución de los genes en los hospitales participantes, además podremos identificar si existe una clona específica circulando en el Hospital para el Niño Poblano y, en particular, si está restringida a algún servicio hospitalario en particular.

Planteamiento del problema

K. pneumoniae es un patógeno emergente que ha incrementado su incidencia en las infecciones asociadas a la atención de la salud. De hecho en el 2023 la RHOVE reporta que dentro de los 5 principales microorganismos causantes de las IAAS (Infecciones asociadas a la atención de la salud) se encontraba *K. pneumoniae*.

El problema de la resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en el contexto de la atención médica y la salud pública es una preocupación creciente que impacta significativamente en el tratamiento de infecciones bacterianas. Aminoglucósidos y quinolonas son dos clases importantes de antibióticos utilizados después de los β -lactámicos, para tratar una amplia gama de infecciones, tanto en entornos hospitalarios como en la comunidad. Sin embargo, la emergencia y propagación de resistencia a estos medicamentos están generando dificultades significativas en el manejo clínico de pacientes y en la lucha contra las infecciones, además, el uso excesivo e inadecuado de estos en el tratamiento de infecciones ha contribuido a la selección y propagación de cepas resistentes de *K. pneumoniae*.

En Puebla, es poco frecuente encontrar información de la prevalencia de los genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos en cepas de *Klebsiella* spp, esto es preocupante, por lo tanto, la obtención de datos es importante no solo para prever la evolución futura de la resistencia a antibacterianos, sino también para establecer tratamientos efectivos y ajustar estrategias terapéuticas. Además, contar con esta

información nos ayudaría a anticipar y prevenir la propagación de cepas resistentes tanto en entornos de atención médica como en la comunidad.

Conocer la prevalencia de los genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos en cepas de *K. pneumoniae*, nos permitirá tener un panorama más amplio de la diseminación de estos genes en casos de infecciones de origen hospitalario. El estudio de incidencia de estos genes de resistencia en cepas causantes de infecciones nosocomiales en el estado de Puebla permitirá obtener una explicación de cómo es la distribución de estos genes dentro de las instituciones participantes para poder implementar medidas preventivas evitando que estos genes se continúen diseminando.

4. Hipótesis científica

Aun cuando es un estudio observacional de frecuencia y este tipo de estudios no lleva hipótesis, podemos plantear como hipótesis: Existe una prevalencia elevada de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en las cepas estudiadas, y tiene una asociación con la presencia de genes de resistencia.

5. Objetivos

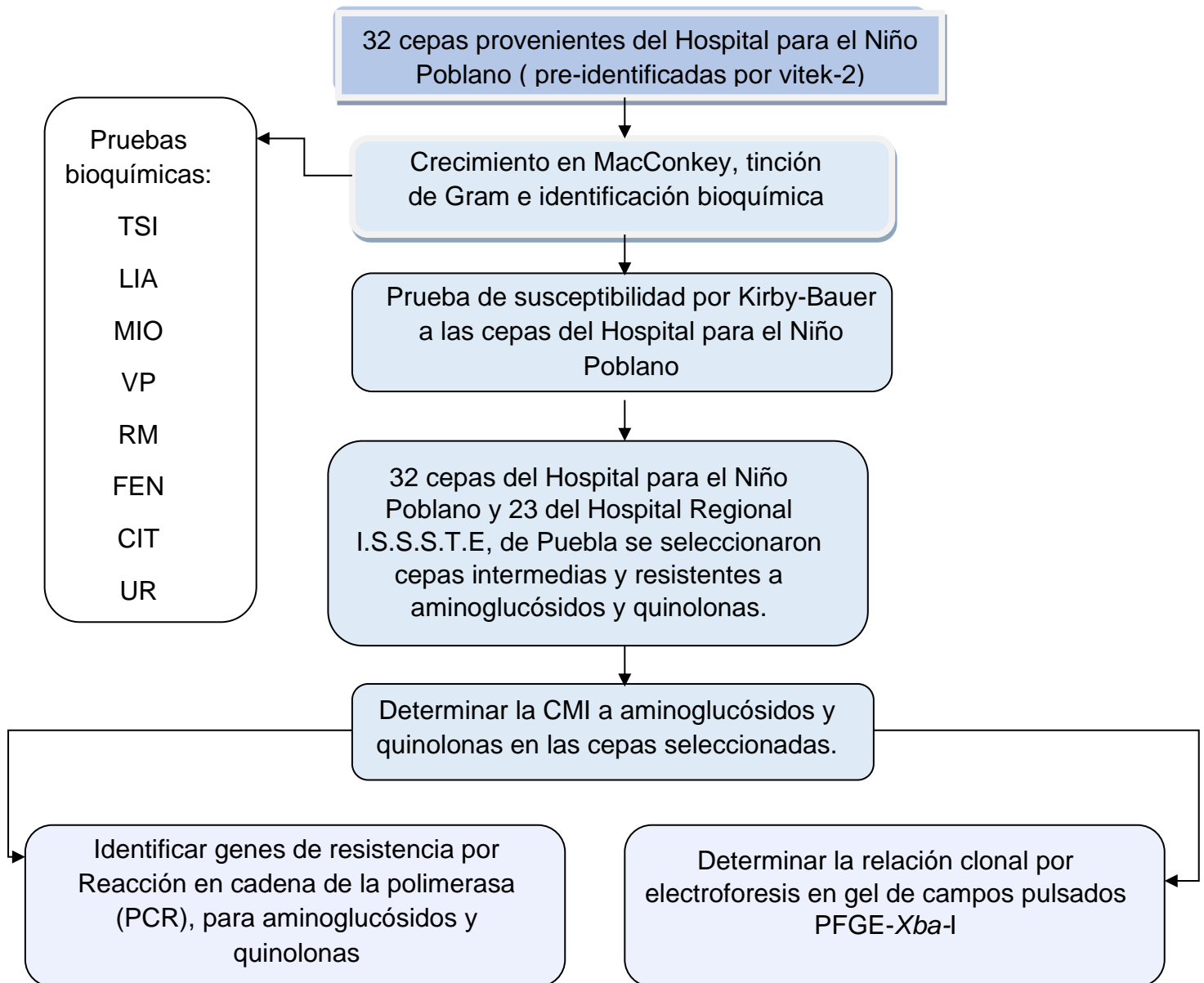
5.2 Objetivo general

Conocer el fenotipo y genotipo de resistencia para aminoglucósidos y quinolonas y su relación clonal en cepas aisladas de *Klebsiella* spp. en dos hospitales.

5.3 Objetivos particulares

- Corroborar el género y pureza a través de pruebas bioquímicas de las cepas de *Klebsiella* spp. del Hospital para el Niño Poblano.
- Determinar el perfil de resistencia a diferentes antibióticos en las cepas del Hospital para el Niño Poblano a través del método de Kirby Bauer a
- Determinar la CMI a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *Klebsiella* spp aisladas de los dos hospitales
- Determinar la presencia de genes implicados en la resistencia a aminoglucósidos (*aac(6')-Ib*, *aac(3)-II*) y quinolonas (*qnrA*, *qnrB*) en cepas de los dos hospitales.
- Determinar la relación clonal de las cepas de *Klebsiella* spp del Hospital para el Niño Poblano

Estrategia de trabajo



Material y métodos

Se trabajaron con 55 cepas: 32 cepas de *Klebsiella* spp., obtenidas entre 2018 al 2021 en el Hospital para el Niño Poblano (HNP/ENS/177/2016), y 23 cepas, obtenidas en el periodo del 2021 a 2022 en el Hospital Regional ISSSTE, de Puebla(188.2018). Las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E fueron previamente analizadas por Yañez Cedillo JA (en revisión) quien realizó las pruebas bioquímicas y determinó el perfil de resistencia. A partir de estos resultados, se llevaron a cabo las pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la búsqueda de genes de resistencia. En

ambos Hospitales se aprobó la cooperación y se cumplieron con los criterios de selección, traslado y conservación de las cepas establecidos. Se incluyeron Cepas del género *Klebsiella spp.*, aisladas de infecciones intrahospitalarias, recuperadas de cualquier tipo de muestra, edad o sexo del paciente. Las muestras fueron recolectadas por personal clínico de cada hospital y fueron identificados a través del sistema automatizado ViteK-2. Posteriormente, se enviaron al laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la comunidad (LMHyC), donde se conservaron en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI- BD Bioxon®) con 10% de glicerol a -70°C.

Para realizar los experimentos, las cepas se sembraron en placas de Agar Triptona-Soja (TSA / BD Bioxon®) utilizando la técnica de estría cruzada y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se realizó un segundo pase en placas nuevas de TSA, con una colonia aislada del primer plaqueo, con la finalidad de recuperar las cepas del estrés por congelación y confirmar su pureza mediante la observación de la morfología colonial. A partir de este segundo inóculo, se prosiguió a realizar los procedimientos.

Condiciones éticas

Las cepas fueron obtenidas en el marco de los protocolos aprobados para su realización por el comité de ética e investigación de los hospitales:

- Hospital regional ISSSTE (188.2018)
- Hospital para el Niño Poblano (HNP/ENS/177/2016)

No se requirió consentimiento informado, dado que las muestras fueron tomadas de forma rutinaria, y solo se trabajó con las cepas aisladas de dichas muestras. Además, los datos de pacientes se mantuvieron en anonimato.

5.4 Técnicas y procedimientos

Corroboración de género, especie y pureza de las cepas

Después de recuperar las cepas de un sembrado en Agar Triptona-Soja (TSA/BD Bioxon®), se sembraron en agar selectivo MacConkey (MCD LAB®), lo que permitió observar las características propias de bacterias gramnegativas fermentadoras de lactosa. Además, se realizaron tinciones de Gram para corroborar la morfología bacilar y destacar la presencia de contaminantes. Una vez confirmada la pureza de los aislamientos, se procedió a su crioconservación a -72°C en crioviales con caldo de infusión cerebro-corazón y Glicerol al 10%.

Se llevaron a cabo pruebas bioquímicas para la identificación del género y especie, estas pruebas nos permitieron identificar entre *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, para esto se prepararon las pruebas bioquímicas de acuerdo con las indicaciones del fabricante

y se pusieron a prueba de esterilidad a 37° por 24 horas. Pasado el tiempo, se llevó a cabo su inoculación y lectura conforme a los lineamientos establecidos.

Tabla 1. Fundamento de las pruebas bioquímicas.

Medio utilizado	Fundamento
LIA	Evalúa la descarboxilación y desaminación de la lisina y la producción de ácido sulfhídrico.
MIO	Evalúa la movilidad, producción de indol (<i>K.pneumoniae</i> : negativo / <i>K. oxytoca</i> : positiva) actividad enzimática ornitina descarboxilasa.
TSI	Evalúa la fermentación de azúcares y la producción de ácido sulfhídrico.
FENILALANINA	Determina la capacidad de un microorganismo para desaminar el aminoácido fenilalanina en ácido fenilpiruvico.
RM-VP	Se lleva a cabo la prueba de Rojo de metilo y Vogues-PROSKAUER, evalúan la producción final de metabolitos de la glucosa.
CITRATO	Evalúa la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía.
UREA	Evalúa si las bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberan amoníaco y dióxido de carbono.

Determinación del fenotipo de resistencia por el método de Kirby-Bauer

La resistencia se determinó por el método de difusión en disco Kirby-Bauer, se probaron 17 antibióticos de 8 familias diferentes (**Tabla 2**).

A partir de una placa de TSA sembrada de forma masiva e incubada 37° por 18 horas, se tomó una muestra con ayuda de un asa bacteriológica y se suspendió en un tubo de ensayo con 2 mL de solución salina isotónica (SSI) al 0.85 % de NaCl hasta ajustar a una turbidez de 0.5 en la escala de McFarlad (1.5×10^8 UFC/ml) utilizando el densitómetro (DEN-1/ bioSan ®).

Se inocularon 3 placas de agar Müeller Hilton (BD Bioxon®) por cepa. Las placas de agar Müeller-Hinton se prepararon días antes del experimento, pasando por prueba de esterilidad. Con un hisopo estéril impregnado con la suspensión, se deslizó por toda la

placa en forma de cultivo masivo, de arriba abajo, en 3 direcciones diferentes, rotando la placa a 60° cada vez y pasando, por último, el hisopo sobre la periferia del agar, a manera que se pueda conseguir un crecimiento uniforme.

Posteriormente, se colocaron los 17 sensidiscos de antibiótico con ayuda de unas pinzas estériles, a una distribución correcta para no generar efectos antagónicos o sinérgicos entre los antimicrobianos. Por cada cepa, se realizaron 3 juegos de placas (Imagen 2). Las placas se incubaron invertidas por 18 horas a 37°C.

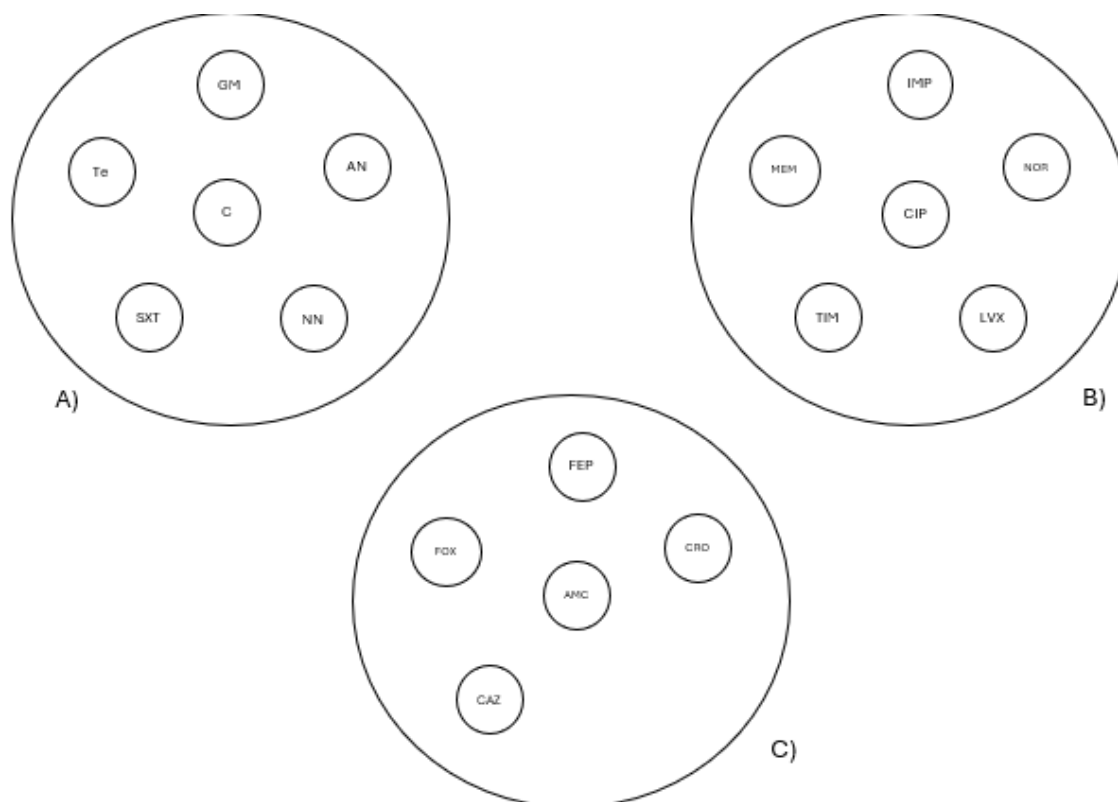


Figura 2. Posición de discos de antibiótico. A): placa 1, GM: gentamicina, AN: amikacina, SXT: Trimetroprim /Sulfametaxazol, Te: tetraciclina, C: cloranfenicol, B) placa 2, IMP: imipenem, NOR: norfloxacino, LVX: levofloxacino, TIM: ticarcilina-ác. clavulánico, MEM: meropenem, CIP: ciprofloxacino, C) placa 3, FEP: cefepime, CRO: ceftriaxona, FOX: cefoxitina, CAZ: ceftazidima, AMC: amoxicilina-ácido clavulánico.

Se midieron los halos de inhibición con ayuda de una regla, y los resultados se interpretaron de acuerdo con los valores establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2023) (**Tabla 2**). La cepa control a utilizar fue *K. pneumoniae* ATCC 7603.

Tabla 2. Antibióticos y valores de referencia utilizados para interpretación de antibiogramas.

Familia de antibióticos	Antibiótico	Contenido por disco	S	I	R
Inhibidores de las β-lactámicas	AMC (amoxicilina/ácido clavulánico)	20/10 μ g	≥ 18	14-17	≤ 13
	TIM (ticarcilina-ác/ác. clavulánico)	75-10 μ g	≥ 20	15-19	≤ 14
Cefalosporinas	FOX (cefotaxima)	30 μ g	≥ 18	15-17	≤ 14
	CRO (ceftriaxona)	30 μ g	≥ 23	20-22	≤ 19
	CAZ (ceftazidima)	30 μ g	≥ 21	18-20	≤ 17
	FEP (cefepima)	30 μ g	≥ 25	19-24	≤ 18
Carbapenémicos	MEM (meropenem)	10 μ g	≥ 23	20-22	≤ 19
	IPM (imipenem)	10 μ g	≥ 23	20-22	≤ 19
Aminoglucosidos	AMK (amikacina)	30 μ g	≥ 20	17-19	≤ 16
	GEN (gentamicina)	10 μ g	≥ 18	15-17	≤ 14
	NN (tobramicina)	10 μ g	≥ 17	13-16	≤ 12
Quinolonas	CIP (ciprofloxacina)	5 μ g	≥ 26	22-24	≤ 21
	LVX (levofloxacino)	5 μ g	≥ 21	17-20	≤ 16
	NOR (norfloxacino)	10 μ g	≥ 17	13-16	≤ 12
Tetraciclinas	Te (tetraciclina)	30 μ g	≥ 15	12-14	≤ 11
Fenicoles	CL (cloranfenicol)	30 μ g	≥ 18	13-17	≤ 12
Sulfonamidas e inhibidores de la vía de folato	SXT (trimetoprim /sulfametoxazol)	1.25 / 23.75 μ g	≥ 16	11-15	≤ 10

valores establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2023).

Con los resultados obtenidos, se realizó la determinación del perfil de resistencia antimicrobiana. Y las cepas fueron clasificadas como:

- Cepas multidrogo-resistentes (MDR): resistentes al menos a un agente en 3 o más categorías de antibióticos que se hayan probado.
- Extremodrogo-resistentes (XDR): resistente al menos un agente de cada categoría probada, pero, sensible a ≥ 1 o 2 categorías de antibióticos probados
- Pandrogo-resistentes (PDR) : resistencia a todos los agentes de todas las categorías de antibióticos probados.

Esto se realizó conforme a las definiciones propuestas por el CLSI y el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antibacteriana (EUCAST por sus siglas en inglés)

Magiorakos et. al., 2012 para bacterias multidrogo-resistentes (MDR), extremodrogo-resistentes (XDR) y pandrogo-resistentes (PDR). Los criterios de Magiorakos son ampliamente utilizados para estandarizar la clasificación de bacterias resistentes a los antibióticos, y están avalados por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (Magiorakos et al., 2012).

Concentración mínima inhibitoria (MIC / CIM)

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es una prueba microbiológica utilizada para determinar la cantidad mínima de un agente antibiótico necesario para inhibir el crecimiento de una bacteria en condiciones de laboratorio.

Se realizaron pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI) con los antibióticos aminoglucósidos y quinolonas por dilución en agar.

En este método se incorporó el antibiótico a evaluar en el medio con agar Mueller-Hilton cuando este se encontraba a una temperatura adecuada y se vertió inmediatamente en placas de Petri.

Se preparó una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antibiótico (**Tabla 3**).

Tabla 3. Antibióticos por evaluar en la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria

Antibiótico	Concentraciones (µg/ml)									
Amikacina (AN)	512	256	128	64	32	16	8			
Ciprofloxacino (CIP)	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	
Norfloxacin (NOR)	128	64	32	16	8	4	2			

Cuando las placas estuvieron gelificadas, se procedió a la inoculación por triplicado.

Para preparar el inóculo, en un tubo de ensayo con 2 mL de solución salina isotónica (SSI) al 0.85 % de NaCl se suspendieron colonias aisladas de un cultivo puro de 24 horas sembrado en agar TSA, y se ajustó a una turbidez de 0.5 en la escala de McFarlad (1.5×10^8 UFC/ml), posteriormente se realizó una dilución 1:10 en tubos eppendorf con solución salina isotónica. Se tomaron 2 µl del inóculo estandarizado y se inocularon por triplicado en cada cuadro correspondiente.

Las placas inoculadas se dejaron a temperatura ambiente hasta que las gotas de inóculo se secaron. Posteriormente, se incubaron a 35 °C durante 18 a 24 horas y posteriormente se procedió a su lectura. La CMI es la concentración menor de antimicrobiano capaz de inhibir completamente el crecimiento bacteriano (no se

considera crecimiento a la aparición de una colonia aislada o de un halo tenue debido al propio inóculo).

La interpretación se realizó de acuerdo con las condiciones marcadas en el CLSI (2023):

Tabla 4. Antibióticos y puntos de corte de acuerdo con el CLSI 2023 para interpretación de Concentración Mínima Inhibitoria.

Antibiótico	R	I	S
Ciprofloxacino	≥ 1	0.12-0.5	≤ 0.06
Amikacina	≥ 16	8	≤ 4
Norfloxacino	≥ 16	8	≤ 4

Tomado de Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023 (*M100Ed33 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition, s. f.*).

Identificación de genes de resistencia

Se realizó lisis bacteriana para obtener el ADN de las cepas en estudio y con base en los resultados de los antibiogramas, se realizaron ensayos de PCR para identificar genes que conferían la resistencia.

Obtención de ADN bacteriano

Se extrajo el templado de ADN por el método de ebullición. A partir de un cultivo puro de 24 horas a 37° C sembrado en agar TSA 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 contenía 800 µl de solución salina isotónica, posteriormente se homogenizó con el vortex y posteriormente se centrifugó a 13, 000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos, pasado el tiempo de centrifugación se eliminó la parte acuosa y se realizaron dos lavados adicionales al paquete celular. Después de los tres lavados se le agregó 800 µl de agua inyectable (PISA®), se homogenizó y se llevó a ebullición durante 10 minutos. Finalmente, se centrifugó a 13, 000 rpm durante 5 minutos y la parte acuosa que contiene el ADN bacteriano se transfirió a otro tubo eppendorf estéril, se rotuló adecuadamente y se almacenó a -20°C hasta su uso. El paquete celular se desechó.

A todos los lisados obtenidos se les realizó cuantificación de la concentración de ADN bacteriano utilizando el equipo NanoDrop 2000® (Thermo Scientific). Antes de realizar

la cuantificación, se calibró el lector utilizando 0.5 µl de agua inyectable estéril como blanco. Entre cada muestra, se limpió el lector para evitar lecturas alteradas. Luego, Se utilizaron 2 µl de muestra para realizar las lecturas, posteriormente, se ajustó la concentración a 200 ng/µl.

Amplificación de genes de resistencia por PCR

La búsqueda de genes de resistencia a antibióticos se realizó mediante la técnica de PCR. Se seleccionaron oligonucleótidos específicos para amplificar los genes de resistencia a aminoglucósidos (*aac*-(3)-II, *aac*-(6')-Ib) y quinolonas (*qnr* A, B).

Tabla 5. Oligonucleótidos y condiciones utilizadas para la amplificación de los distintos genes que determinan resistencia a quinolonas y aminoglucósidos.

Gen	Tamaño del amplificado	Oligonucleótidos	Condiciones			Referencia
<i>aac</i> -(3)-II	237 pb	F: ACTCTGATGGGATACGCGTC R: CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	94°C 5 MIN	Desnaturalización Inicial	32 °C	(Vliegenthart <i>et al.</i> , 1989)
			94°C 30 seg	Desnaturalización		
			60°C 45 seg	Alineamiento		
			72°C 2 MIN	Elongación		
			72°C 8 MIN	Elongación final		
<i>aac</i> (6')-Ib	482 pb	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	94°C 5 MIN	Desnaturalización Inicial	20 °C	(Park <i>et al.</i> , 2006)
			94°C 45 seg	Desnaturalización		
			60°C 45 seg	Alineamiento		
			72°C 45 seg	Elongación		
			72°C 5 MIN	Elongación final		
<i>qnr</i> A	580 pb	F:AGAGGATTTCTCACGCCAGG R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC	95°C 10 MIN	Desnaturalización Inicial	25 °C	(Cattoir <i>et al.</i> , 2007)
			95°C 45 seg	Desnaturalización		
			58°C 45 seg	Alineamiento		

			72°C 15 seg	Elongación		
			72°C 3 MIN	Elongación final		
qnrB	264 pb	F: GGMATHGAAATTGGCCACTG	94°C 5 MIN	Desnaturalización Inicial	32 °C	(Cattoir <i>et al.</i> , 2007)
		R: TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA	94°C 0:45 seg	Desnaturalización		
			53°C 0:45 seg	Alineamiento		
			72°C 1 MIN	Elongación		
			72°C 5 MIN	Elongación final		

Para las reacciones de PCR se utilizó un volumen final de 10 µl, que contenía los componentes en volúmenes y concentraciones siguientes:

Tabla 6. Elementos y cantidades utilizadas para las reacciones de PCR.

Componentes	Concentración de stock	Volumen por tubo	Concentración final de reacción
Agua		7.15 µl	
Buffer + MgCl ₂	10 x	1 µl	1 x
dNTP's	10 µM	0.2 µl	0.2 µM
Oligonucleótido Forward	10 µM	0.3 µl	0.3 µM
Oligonucleótido Reverse	10 µM	0.3 µl	0.3 µM
Taq	5 U/ µl	0.05 µl	0.25 U
DNA	200 ng/ µl	1 µl	
Volumen final	-	10 µl	-

Electroforesis de los productos de PCR

Los productos de PCR se migraron en geles de agarosa al 1.5% utilizando una cámara de electroforesis con TAE al 1X, durante 35-45 min a 100 V. En el primer pozo se utilizó el marcador de peso molecular Generuler 100 pb plus ADN ladders (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). En los pozos siguientes se colocó una mezcla con 3 µl de DNA bacteriano y 1µl del buffer de carga. El marcador de peso molecular solo se usó al buscar el gen en las cepas utilizadas como control (**Tabla 7**); una vez obtenidos los controles, ya no se utilizó. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 µl/ 200 ml- I, Sigma, Aldrich, St. Louis, MO, USA,). Finalmente, se visualizó el gel en un transiluminador ultravioleta MiniBIS Pro-DNR Bio-Imaging Systems.

Tabla 7. Cepas control utilizadas para la amplificación de los genes de interés.

Microorganismo	Cepa	Gen control	Referencia
<i>E. coli</i>	CUA44	<i>qnrA</i>	Tesis de licenciatura Alcalá-Martínez, 2023
<i>K. pneumoniae</i>	KpS2	<i>qnrB</i>	Tesis de licenciatura Flores-percino, 2022
<i>K. pneumoniae</i>	KPE46	<i>aac(3)-II</i>	Tesis de licenciatura Flores-percino, 2022
<i>E. coli</i>	C7226	<i>aac(6')-Ib</i>	Tesis de Doctorado Cortés-Cortes, 2016

DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN CLONAL

Se determinó la relación clonal de las cepas de *Klebsiella* spp mediante Electroforesis en Gel de Campos Pulsados utilizando la enzima Xba-1 (PFGE-Xba1) .

Preparación de la suspensión bacteriana

A partir de un cultivo puro sembrado en forma masiva en una placa de agar TSA suplementado con 1.5% más de agarosa, incubado durante 24 horas a 37°C, se tomó 3 asadas y se recolectó en un tubo eppendor con 800 µl de solución salina estéril y se homogeneizó. Se realizaron tres lavados con solución salina isotónica. Posteriormente, se resuspendió una alícuota del paquete celular en 1 ml buffer TE (10 mM Tris-HCl pH=8,0, 1 mM EDTA pH=8,0) y se ajustó la turbidez a 4 de la escala de MacFarland ($1,2 \times 10^9$ UFC/mL).

Preparación de insertos

Se preparó agarosa gel de bajo punto de fusión al 1.5% en buffer TE 1X (10mM Tris y 1mM EDTA) y se distribuyó 500 µl en microtubos de 1.5 ml y se mantuvieron a 54°C en baño María hasta su uso. Posteriormente se mezclaron con 500 µl de la suspensión bacteriana con 500 µl de agarosa y se distribuyó en moldes (insertos) cuidadosamente. Se dejó solidificar unos minutos en refrigeración.

Lisis Bacteriana

Se emplearon 3 insertos por cepa, a los que se añadió 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.

Lavado de los Insertos

Después de llevarse a cabo la lisis, se eliminó el buffer de lisis, se recuperó el inserto en una placa de Petri estéril y se llevó a cabo los siguientes lavados en tubos falcón de 15 ml:

- 3 lavados con 10 ml de agua destilada estéril 10 min / 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 uso.

Digestión Enzimática

Como volumen final del buffer de digestión se usó 200 µl para cada muestra, compuesta por : 179 µl de agua destilada estéril, 20 µl del buffer de la enzima y 1 µl de la enzima Xba1, posteriormente se colocó una cuarta parte del inserto en un tubo eppendorf que contenía la mezcla de digestión, observando que se haya cubierto totalmente y se incubó por 18 horas a 37°C.

Preparación del gel de agarosa

Para la separación de los fragmentos se preparó agarosa Biorad (Pulsed Field Certified Agarose, BioRad®) al 1% en TBE 0.5X, se vertió sobre el molde y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Posteriormente se rellenaron los pozos con el cuarto de inserto digerido y se sellaron con agarosa a la misma concentración.

Electroforesis

La electroforesis se llevó a cabo en una cámara de campos pulsados CHEF-DR II (BioRad) con 2,850 mL de TBE 0.5X frío suplementado con tiourea 75µM (0.0162 g). Las condiciones para el corrimiento de electroforesis empleadas se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones del corrimiento electroforético de la PFGE-Xba1.

Condiciones	
Gradiente de voltaje	6 V/cm
Rampa inicial	1 seg
Rampa final	30 seg
Tiempo de corrimiento	23 h
temperatura	14 °C

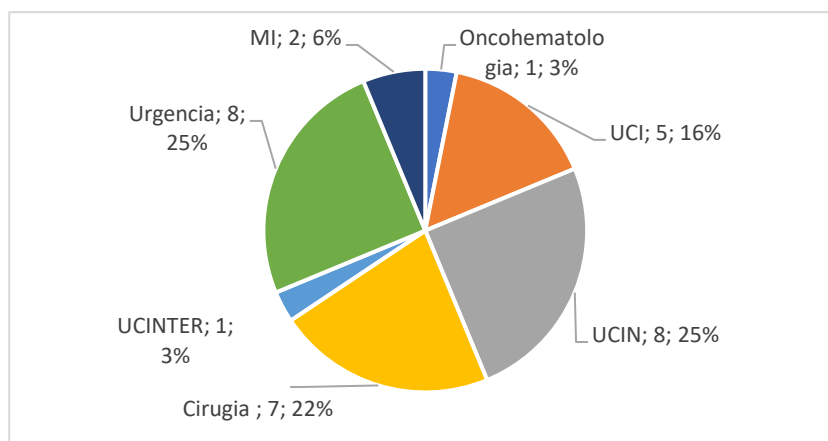
Tinción de gel y visualización

Se tiñó el gel en una solución acuosa de bromuro de etidio (10 µl/ 200 ml). 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.

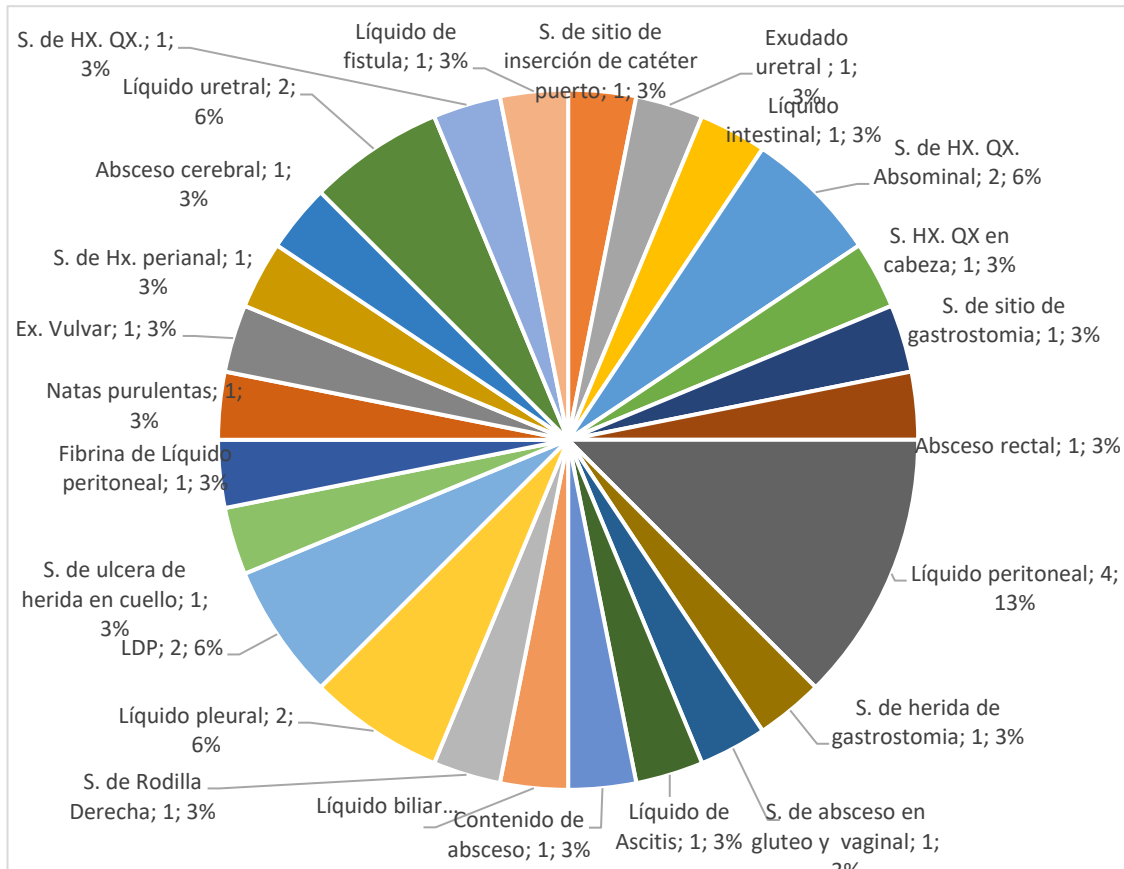
Para realizar el análisis de las imágenes capturadas de gel de campos pulsados (PFGE), se utilizó el programa GelQuant express Analysis Software. Los patrones de bandeo se compararon usando el coeficiente de Dice/UPGMA mediante el programa NTSYS pc 2.21q software y se obtuvo el dendograma

RESULTADOS

Se trabajaron un total 30 cepas de *K. pneumoniae* y 2 cepas de *K. oxytoca* provenientes del Hospital para el Niño Poblano. Las cepas fueron recolectadas de los servicios hospitalarios de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN), Unidad de atención pediátrica general (U) y Cirugía (CX). La mayoría de las cepas se obtuvieron de líquido peritoneal, diversas secreciones y otros líquidos (**Gráfica 1 y 2**).



Gráfica 1. Principales servicios hospitalarios de aislamiento de las cepas de *Klebsiella* spp. aisladas del Hospital para el Niño Poblano (n=32). UCIN: Unidad de cuidados intensivos neonatales, UCI: Unidad de cuidados intensivos pediátricos, MI: medicina interna, UCINTER: Unidad de cuidados intensivos intermedios.



Gráfica 2. Porcentaje de cepas de *Klebsiella* spp. por origen de la muestra (n=32). LDP: líquido de diálisis peritoneal

Corroborar pureza, género y especie de las cepas de *Klebsiella* spp. del Hospital para el Niño Poblano.

Se sembraron las 32 cepas en agar MacConkey, donde se observaron colonias mucoides de color rosado, lo que indica la fermentación de lactosa (LAC+). Además, a través de la tinción de Gram, se identificaron bacilos Gram negativos, presentes de forma individual y en cadenas cortas. Mediante estas pruebas, se verificó la pureza de las cepas, asegurando la ausencia de contaminantes como bacterias Gram positivas, cocos o cepas lactosa negativas. A las 32 cepas se les realizaron pruebas bioquímicas

para la confirmación de género y especie a través de 7 pruebas de metabolismo (Pruebas bioquímicas; presentadas en **Tabla 1**). Como resultado, se obtuvieron 30 cepas de la especie *K. pneumoniae* y 2 de la especie *K. oxytoca* (**Tabla 9**)

Tabla 9. Resultados representativos de las pruebas bioquímicas en cepas de *Klebsiella* spp.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS										
Clave	Medio MacConkey	Tinción de Gram	LIA	MIO	CIT	F	TSI	RM-VP	UREA	Microorganismo
KpNP1	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas- SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP2	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP3	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP4	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP5	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas- SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP6	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas- SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP7	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP8	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP9	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP10	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP11	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP12	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP13	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP14	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP15	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP16	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP17	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP18	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP19	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP20	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP21	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VG:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP22	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VP:-	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP23	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VP:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP24	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VP:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP25	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VP:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP26	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VP:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP27	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VP:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP28	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VP:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP29	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VP:+	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
KpNP30	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VP:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KpNP31	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VP:-	+	<i>Klebsiella oxytoca</i>
KpNP33	LAC+	gramnegativa	K/K gas: + SH2:-	M: - l: - O:-	+	-	A/A Gas+ SH2-	RM: - VP:+	+	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

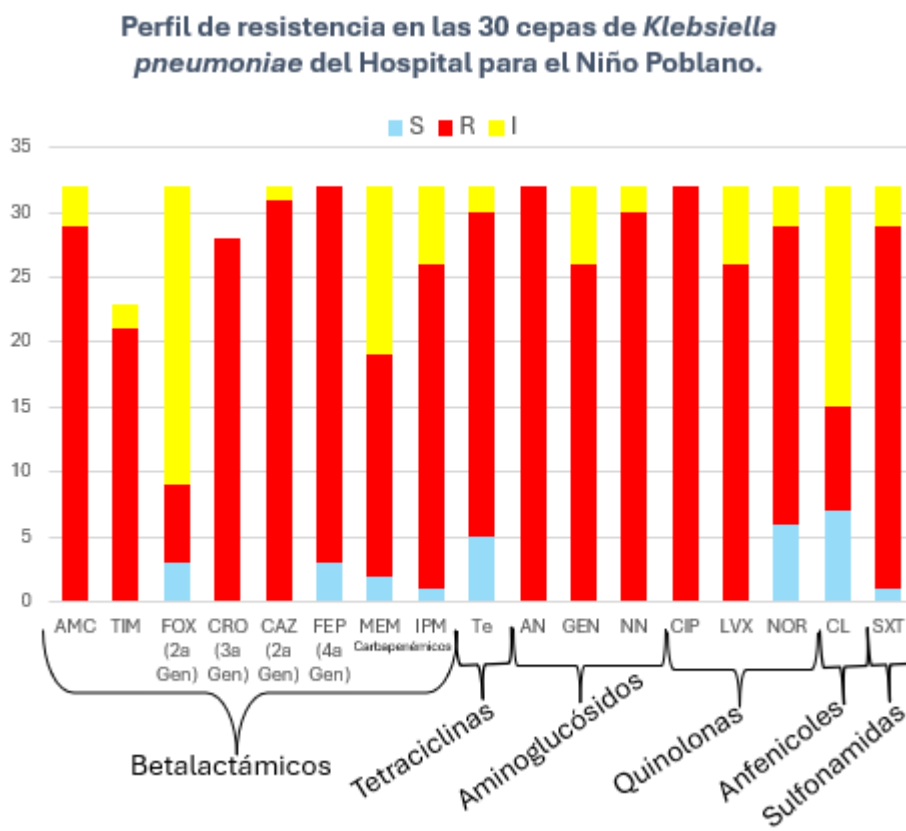
K/: básico/básico, +: positivo, M: movilidad, l: Indol, O: Ornitina, LIA: lisina Hierro agar, CIT: citrato, F: fenilalanina, TSI: Agar Hierro Triple azúcar, RM: rojo de metil, VG: Voges Proskauer

Determinación el perfil de resistencia a diferentes antibióticos a través del método de Kirby Bauer a las cepas del Hospital para el Niño Poblano.

Después de completar la identificación, se realizó antibiograma para determinar el perfil fenotípico de resistencia a 17 antibióticos pertenecientes a 8 familias mediante el método Kirby-Bauer. Se analizaron 30 cepas de *K. pneumoniae* y 2 cepas de *K. oxytoca* (**Tabla 9**).

En el **gráfico 3** se muestra que el 93% (28/30) de las cepas de *K. pneumoniae* presentó resistencia amoxicilina- ácido clavulánico, el 95% (20/21) a ticarcilina- ácido clavulánico, el 17% (5/30) a cefoxitina, el 100% (26/26) a ceftriaxona, el 97% (29/30) a ceftazidima, 93% (28/30) a cefepime, 57% (17/30) a meropenem, 80% (24/30) a imipenem, 80% (24/30) a tetraciclina, 100% (30/30) a amikacina, 83% (25/30) gentamicina, 93% (28/32) a tobramicina, 100% (30/30) a ciprofloxacino, 83% (25/30) a levofloxacino, 73% (22/30) a norfloxacino, 23% (7/30) a cloranfenicol y 90% (27/30) a trimetoprim sulfametoxazol.

En cuanto a la resistencia por categorías de antibióticos, el 57% (17/30) de las cepas presento resistencia a 5 de los 6 antibióticos β -lactámicos probados (incluidos los inhibidores de β -lactamasas). para los carbapenémicos, el 57% (17/30) presento resistencia a los 2 antibióticos probados, en el caso de los aminoglucósidos , el 83% (25 /30) presento resistencia a los 3 antibióticos de este grupo, mientras que para el 70% (21/30) de las cepas mostró resistencia a los tres antibióticos fluoroquinolonas evaluadas.



Gráfica 3. Perfil fenotipo de resistencia de las 30 cepas de *K. pneumoniae*. AMC: amoxicilina- ácido clavulánico, TIM: ticarcilina- ácido clavulánico, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, MEM: meropenem, IPM: imipenem, TE: tetraciclina, AN: amikacina, GM: gentamicina, NN: tobramicina, CIP: ciprofloxacino, LVX: levofloxacino, NOR: norfloxacino, CL: cloranfenicol y SXT: trimetoprim sulfametoxazol. S: Sensible (azul), I: Intermedio (amarillo), R: resistente (rojo)

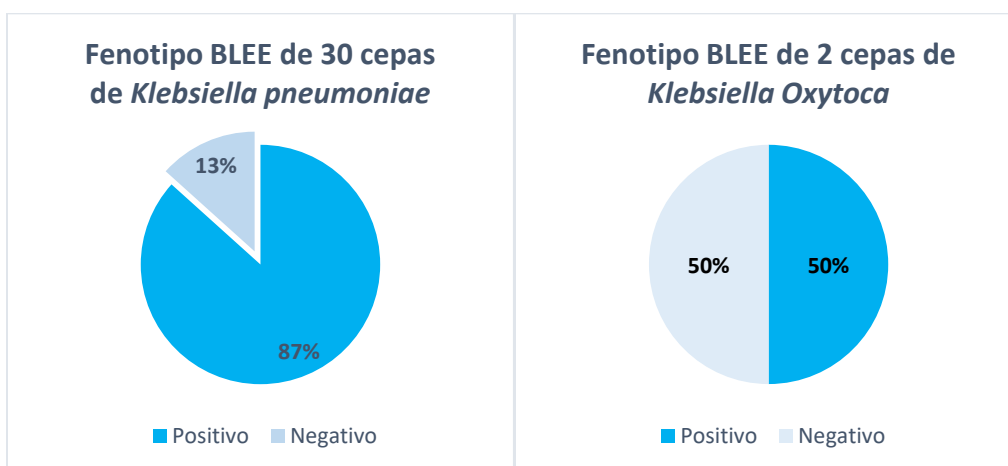
De las 30 cepas de *K. pneumoniae*, se observó que el 77% se clasificaron dentro de cepas PDR (Pandrogó- resistentes), mientras que el 23% se clasificaron como MDR (Multidrogó-resistente) de acuerdo con los criterios de Magiorakos *et. al.*, 2011 se considera PDR cuando es resistente a todos los antibióticos probados en todas las categorías sin ninguna susceptibilidad (Anexo 1).

En cuanto a las cepas de *K. oxytoca*, KpNp 29 fue resistente a las cefalosporinas ceftriaxona y ceftazidima, y mostró resistencia intermedia a los inhibidores de β -lactamasas (amoxicilina- ácido clavulánico y ticarcilina- ácido clavulánico) dentro de la familia de los β -lactamicos. Para los carbapenémicos, presentó resistencia intermedia a imipenem. En cuanto a los aminoglucósidos, fue resistente a amikacina y tobramicina, y mostró resistencia intermedia a gentamicina. En el grupo de las fluoroquinolonas solo mostró resistencia a ciprofloxacino, mientras que levofloxacino mostró resistencia intermedia. Finalmente, fue sensible a cloranfenicol y resistente a trimetoprim-sulfametoxazol. Por su parte, la cepa KpNp 31 fue resistente a los inhibidores de β -lactamasas (amoxicilina- ácido clavulánico y ticarcilina- ácido clavulánico) y a todas las cefalosporinas evaluadas (cefoxitina, Ceftriaxona, Ceftazidima y cefepime). Para los carbapenémicos, presentó resistencia únicamente a imipenem. En cuanto a los aminoglucósidos, mostró resistencia a todos los evaluados (amikacina, gentamicina y tobramicina), dentro de las fluoroquinolonas, fue resistente a ciprofloxacino, levofloxacino y norfloxacino. Finalmente, esta cepa mostró resistencia a tetraciclina y cloranfenicol, y presentó intermedia a trimetropim-sulfametoxazol

Tabla 10. Perfil de resistencia de las cepas de *K. oxytoca* del hospital para el Niño Poblano.

cepa	Perfil de resistencia
KpNP 29	CRO, CAZ, AN, NN, CIP, SXT
KpNP 31	AMC, TIM, FOX, CRO, CAZ, FEP, IPM, Te, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, CL
Abreviaturas: AMC: amoxicilina- ácido clavulánico, TIM: ticarcilina- ácido clavulánico, FOX: cefoxitina, CRO: ceftriaxona, CAZ: ceftazidima, FEP: cefepime, IPM: imipenem, TE:tetraciclina, AN: amikacina, GM: gentamicina, NN: tobramicina, CIP: ciprofloxacino, LVX: levofloxacino, NOR: norfloxacino, CL: cloranfenicol y SXT: trimetoprim sulfametoxazol.	

El fenotipo BLEE se observó en el 87% (26/32) de las cepas de *K. pneumoniae*, mientras que en *K. oxytoca* se observó en el 50% (1/2) de las cepas, mientras que el fenotipo AmpC no se observó en ninguna cepa de las dos especies (**Gráfico 4; anexo 1**).



Gráfica 4. Fenotipo observado en las cepas de *K. pneumoniae* y *oxytoca*.

Determinación de la CMI a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* aisladas de dos hospitales: Hospital para el Niño Poblano y del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla.

Las cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* utilizadas en este estudio fueron aisladas de dos hospitales: Hospital para el Niño Poblano y el Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla. Yañes-Cedillo, 2024, realizó las pruebas bioquímicas y el perfil de resistencia inicial a través de Kirby-Bauer de las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla. Posteriormente, a partir de estos resultados preliminares, se procedió a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para aminoglucósidos y quinolonas, con el objetivo de evaluar los niveles de resistencia en las cepas aisladas. La inclusión de cepas de ambos hospitales se debe a su importancia de centros de atención médica en la región, permitiendo obtener un conjunto de cepas representativas de las infecciones causadas por *Klebsiella* spp.

Se trabajó con un total de 48 cepas, de las cuales 32 cepas provenían del Hospital para el Niño Poblano (30 cepas *K. pneumoniae* y 2 cepas de *K. oxytoca*) y 16 cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. de Puebla (15 cepas *K. pneumoniae* y 1 cepa *K. oxytoca*), todas inicialmente mostraron resistencia o resistencia intermedia en el Kirby-Bauer a la amikacina.

Al realizar la determinación de CMI, de las 32 cepas del Hospital para el Niño Poblano, se identificó que solo 8 tenían resistencia a la amikacina, 6 cepas *K. pneumoniae* y 2 cepas *K. oxytoca* con valores de CMI iguales o superiores a 16 µg/mL. En particular, las cepas KpNP 9 y KpNP 28 mostraron una resistencia extremadamente alta, con CMI ≥ 128 µg/mL (**Tabla 11, Anexo 2**). Además 11 cepas se clasificaron con resistencia intermedia, mientras que 13 cepas mostraron sensibilidad a la amikacina.

En el caso de las 15 cepas de *K. pneumoniae* y 1 cepa de *K. oxytoca* del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, inicialmente 8 cepas de *K. pneumoniae* mostraron resistencia, 7 cepas de *K. pneumoniae* y 1 cepa de *K. oxytoca* se encontraban en el rango intermedio, según el método de Kirby-Bauer. Al aplicar la prueba de CMI, se encontró que, de las 8 cepas que mostraron resistencia en Kirby-Bauer, 6 cepas de *K. pneumoniae* mantuvieron esta resistencia con CMI mayores a 16 µg/mL, incluso superiores a 128 µg/ml, como es el caso KpN 6, y KpN9, mientras que 2 cepas pasaron al rango intermedio. En cuanto a las 7 cepas de *K. pneumoniae* y 1 cepa de *K. oxytoca* que estaban en el rango intermedio según Kirby-Bauer, solo 1 cepa de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* resultaron ser resistentes según la CMI, 4 fueron intermedias y 3 resultaron sensibles a la amikacina. En total, se identificaron 8 cepas resistentes y 5 cepas con resistencia intermedia (Anexo 2).

Para la familia de las quinolonas, se emplearon norfloxacin y ciprofloxacino para determinar la concentración mínima inhibitoria.

22 cepas de *K.pneumoniae* y 1 cepa de *K.oxytoca* del Hospital del Niño Poblano, solo 22 cepas de *K. pneumoniae*. mostraron resistencia a norfloxacin por el método de Kirby-Bauer, al realizar la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI), se observó un cambio en la resistencia, obteniendo solo 3 cepas de *K.pneumoniae* y 1 cepa *K. oxytoca* con una concentración mínima inhibitoria elevada de 32 a ≥ 128 µg/mL y 13 cepas de *K. pneumoniae* se encontraron en el rango de resistencia intermedia con punto de corte igual a 8 µg/ml mientras que 6 cepas resultaron sensibles (Anexo 3).

En cuanto a las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, 14 cepas de *K. pneumoniae* mostraron resistencia a norfloxacin en el método de Kirby-Bauer. Al realizar la prueba de concentración mínima inhibitoria (CMI), se obtuvieron 12 cepas de *K. pneumoniae* con una concentración mínima inhibitoria elevada, variando de 32 a ≥ 128 µg/ml (**Tabla 11**) y 2 cepas resultaron sensibles con un punto de corte de 4 µg/ml.

De las 30 cepas de *K. pneumoniae* y 2 cepas de *K. oxytoca* que inicialmente mostraron resistencia a ciprofloxacino según el método de Kirby-Bauer del Hospital del Niño Poblano, se identificó que solo 26 cepas de *K. pneumoniae* eran resistentes cuando se evaluaron con el método de CMI y las 2 cepas de *K. oxytoca* resultaron sensibles. Algunas cepas presentaron CMI bajas (por ejemplo, 1 µg/ml), mientras que otras muestran CMI mucho más altos (por ejemplo, 64 µg/ml o incluso más de 128 µg/ml).

Se evaluaron 22 cepas de *K. pneumoniae* del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, las cuales mostraron resistencia según el método de Kirby-Bauer a ciprofloxacino. Posteriormente, se determinó la CMI para cada cepa, todas las cepas fueron resistentes a ciprofloxacino, presentado concentraciones por encima de los puntos de corte establecidos.

Tabla 11. Concentración Mínima inhibitoria de amikacina, norfloxacino y ciprofloxacino en cepas de K. pneumoniae el Hospital para el Niño Poblano y Hospital regional I.S.S.S.T.E de Puebla.

Cepa	CMI (µg/ml)		
	Amikacina	Norfloxacino	Ciprofloxacino
KpNP 1	32 µg/ml (R)	4 µg/ml (S)	1 µg/ml (R)
KpNP 2	4 µg/ml (S)	8 µg/ml (I)	2 µg/ml (R)
KpNP 3	4 µg/ml (S)	8 µg/ml (I)	2 µg/ml (R)
KpNP 4	128 µg/ml (R)	2 µg/ml (S)	1 µg/ml (R)
KpNP 5	8 µg/ml (I)	128 µg/ml (R)	64 µg/ml (R)
KpNP 6	1 µg/ml (S)	2 µg/ml (S)	0.125 µg/ml (S)
KpNP 7	8 µg/ml (I)	8 µg/ml (I)	8 µg/ml (R)
KpNP 8	1 µg/ml (S)	2 µg/ml (S)	1 µg/ml (R)
KpNP 9	>128 µg/ml (R)	2 µg/ml (S)	0.125 µg/ml (S)
KpNP 10	4 µg/ml (S)	2 µg/ml (S)	0.125 µg/ml (S)
KpNP 11	16 µg/ml (R)	8 µg/ml (I)	4 µg/ml (R)
KpNP 12	4 µg/ml (S)	8 µg/ml (I)	4 µg/ml (R)
KpNP 13	8 µg/ml (I)	2 µg/ml (S)	4 µg/ml (R)
KpNP 14	8 µg/ml (I)	2 µg/ml (S)	4 µg/ml (R)
KpNP 15	2 µg/ml (S)	2 µg/ml (S)	2 µg/ml (R)
KpNP 16	2 µg/ml (S)	2 µg/ml (S)	1 µg/ml (R)
KpNP 17	4 µg/ml (S)	8 µg/ml (I)	2 µg/ml (R)
KpNP 18	4 µg/ml (S)	8 µg/ml (I)	2 µg/ml (R)
KpNP 19	8 µg/ml (I)	8 µg/ml (I)	4 µg/ml (R)
KpNP 20	8 µg/ml (I)	8 µg/ml (I)	4 µg/ml (R)
KpNP 21	4 µg/ml (S)	>128 µg/ml (R)	>128 µg/ml (R)
KpNP 22	8 µg/ml (I)	4 µg/ml (S)	4 µg/ml (R)
KpNP 23	2 µg/ml (S)	32 µg/ml (R)	32 µg/ml (R)
KpNP 24	8 µg/ml (I)	8 µg/ml (I)	8 µg/ml (R)
KpNP 25	8 µg/ml (I)	NR	2 µg/ml (R)
KpNP 26	2 µg/ml (S)	8 µg/ml (I)	4 µg/ml (R)
KpNP 27	16 µg/ml (R)	NR	0.25 µg/ml (S)
KpNP 28	>128 µg/ml (R)	NR	16 µg/ml (R)
KpNP 30	8 µg/ml (I)	8 µg/ml (I)	4 µg/ml (R)
KpNP 33	8 µg/ml (I)	8 µg/ml (I)	4 µg/ml (R)
KpN 1	128 µg/ml (R)	128 µg/ml (R)	64 µg/ml (R)
KpN 2	8 µg/ml (I)	NR	4 µg/ml (R)
KpN 3	16 µg/ml (R)	NR	4 µg/ml (R)
KpN 4	NR	>128 µg/ml (R)	128 µg/ml (R)
KpN 5	32 µg/ml (R)	>128 µg/ml (R)	128 µg/ml (R)
KpN 6	>128 µg/ml (R)	64 µg/ml (R)	64 µg/ml (R)

KpN 7	16 µg/ml (R)	4 µg/ml (S)	64 µg/ml (R)
KpN 8	8 µg/ml (I)	NR	4 µg/ml (R)
KpN 9	>128 µg/ml (R)	128 µg/ml (R)	2 µg/ml (R)
KpN 10	NR	NR	64 µg/ml (R)
KpN 11	2 µg/ml (S)	>128 µg/ml (R)	4 µg/ml (R)
KpN 13	NR	>128 µg/ml (R)	128 µg/ml (R)
KpN 14	NR	>128 µg/ml (R)	128 µg/ml (R)
KpN 15	NR	4 µg/ml (S)	4 µg/ml (R)
KpN 16	16 µg/ml (R)	NR	4 µg/ml (R)
KpN 17	NR	32 µg/ml (R)	32 µg/ml (R)
KpN 18	NR	64 µg/ml (R)	64 µg/ml (R)
KpN 19	2 µg/ml (S)	NR	1 µg/ml (R)
KpN 20	8 µg/ml (I)	NR	4 µg/ml (R)
KpN 21	2 µg/ml (S)	>128 µg/ml (R)	128 µg/ml (R)
KpN 22	16 µg/ml (R)	16 µg/ml (R)	>128 µg/ml (R)
KpN 23	8 µg/ml (I)	NR	4 µg/ml (R)

Los puntos de corte de CMI utilizados fueron los siguientes: ciprofloxacino: R: ≥ 1 µg/ml, I: 0.12-0.5 µg/ml, S: ≤ 0.06 µg/ml, amikacina: R: ≥ 16 µg/ml, I: 8 µg/ml, S: ≤ 4 µg/ml, norfloxacino: R: ≥ 16 µg/ml, I: 8 µg/ml, S: ≤ 4 µg/ml. Rojo: Resistente (R), Azul: Sensible (S), Negro: Intermedio (I), NR: No realizado. Las pruebas de sensibilidad fueron realizadas mediante el método de dilución en agar, siguiendo los criterios establecidos por el CLSI, 2023.

Detección de genes de resistencia a aminoglucósidos

Para la búsqueda de genes de resistencia a aminoglucósidos, se trabajó con un total de 17 cepas de *K. pneumoniae* y 2 cepas *K. oxytoca* del Hospital para el Niño Poblano, las cuales fueron seleccionadas con base a su resistencia y resistencia intermedia a amikacina determinadas mediante el método de CMI. Además se incluyeron 12 cepas *K. pneumoniae* y 1 cepa *K. oxytoca* del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, también seleccionadas por su resistencia y resistencia intermedia según la CMI a amikacina, dando un total de 32 cepas para la búsqueda de genes de resistencia a aminoglucósidos .

A las 29 cepas de *K. pneumoniae* y 3 cepas de *K. oxytoca* se les realizó la prueba de PCR para detección de los genes *aac(6')-Ib* (482 pb), *aac(3)-II* (237 pb), los cuales codifican para enzimas modificadoras de aminoglucósidos.

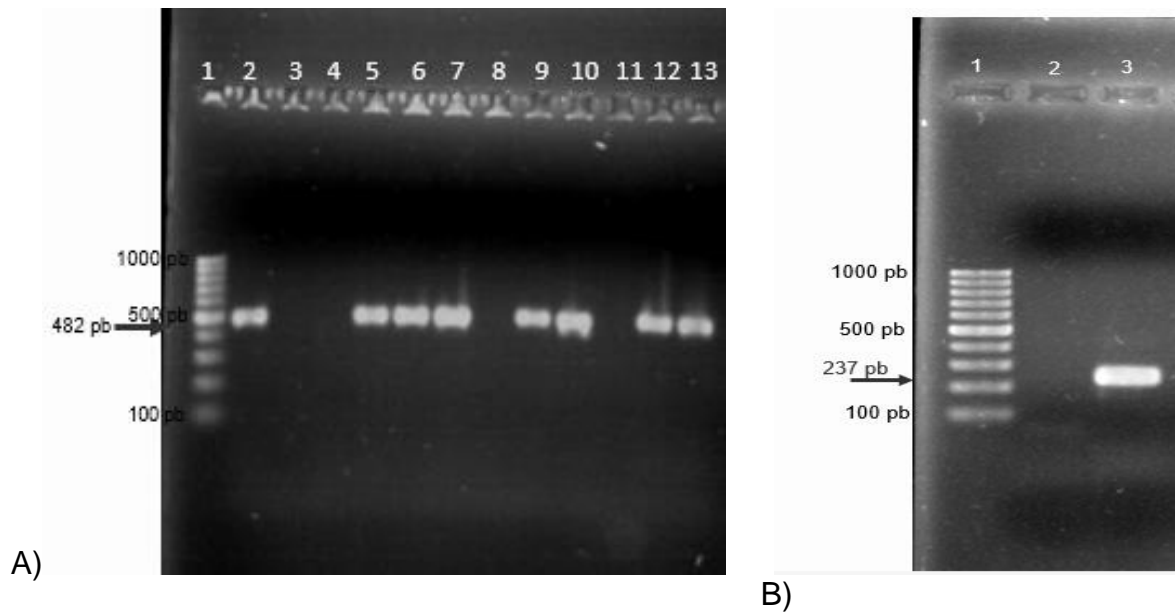
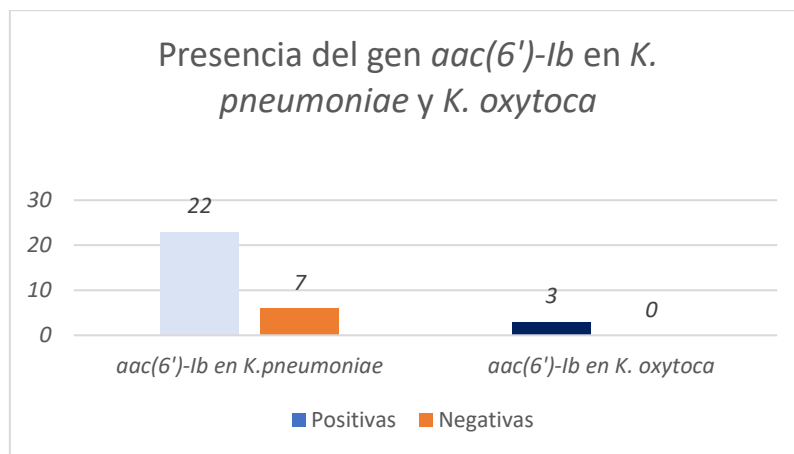


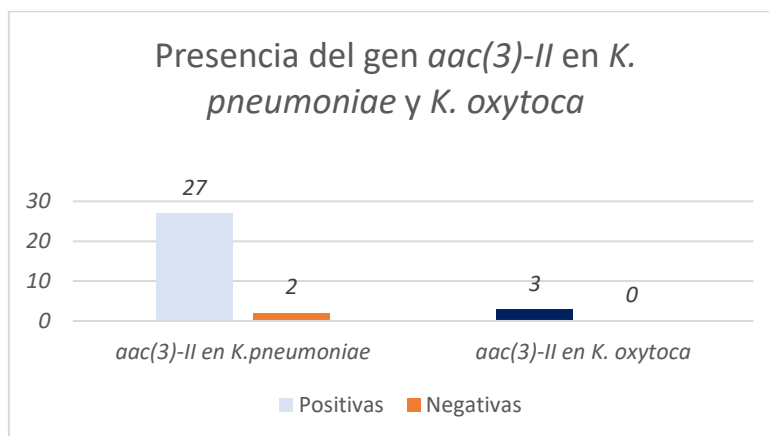
Figura 3 Detección de los genes *aac(6')-Ib* (482 pb), *aac(3)-II* (237 pb). A) *aac(6')-Ib*, Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: control positivo *E. coli* C7226 Carril 3: blanco, carril 4: Kpn 1, carril 5: Kpn 2, carril 6: Kpn3, carril 7: Kpn 5, carril 8: Kpn6, carril 9: kpn7, carril 10: Kpn8, carril 11: Kpn9, carril 12: kpn12, carril 13: Kpn 16, carril 14: Kpn20 B) *aac(3)-II*, Carril 1: marcado de peso molecular, Carril 2: blanco, Carril 3: control positivo cepa *K.pneumoniae* KPE46

El 76% (22/29) de las cepas de *K. pneumoniae* fueron positivas al gen *aac(6')-Ib*, para las cepas *K. oxytoca* el 100% (3/3) fueron positivas al gen (**Gráfica 5; Anexo 2**).



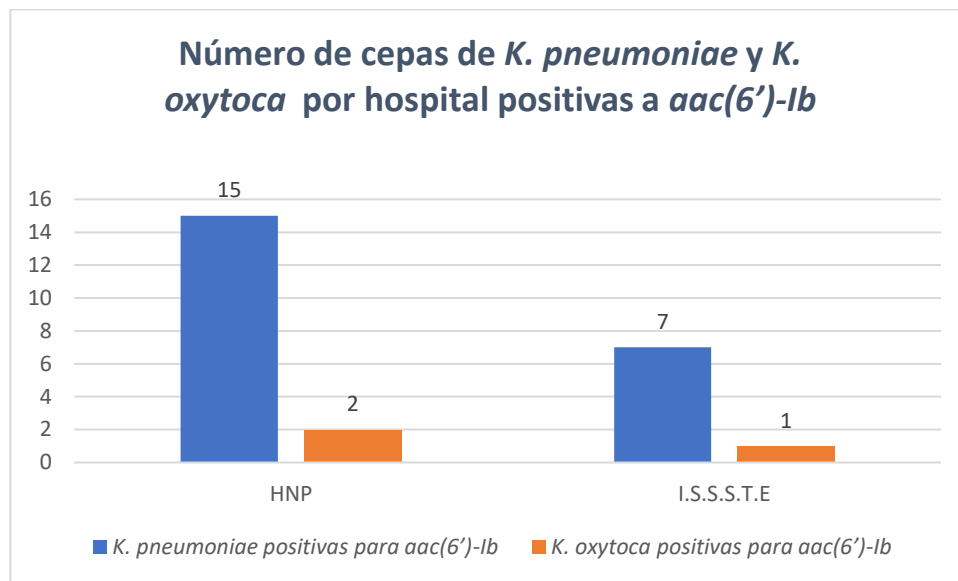
Gráfica 5. Presencia del gen de resistencia *aac(6')-Ib* en las cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. Azul claro: positivas al gen *aac(6')-Ib* en cepas de *K.pneumoniae* (n=22) , Naranja: cepas de *K. pneumoniae* negativas al gen *aac(6')-Ib* (n=7); Azul marino: cepas de *K. oxytoca* positivas al gen *aac(6')-Ib* (n=3).

Mientras que para gen *aac(3)-II*, el 93% (27/29) de las cepas de *K. pneumoniae* y el 100% (3/3) de las cepas de *K. oxytoca* resultaron positivas (**Gráfica 6**).

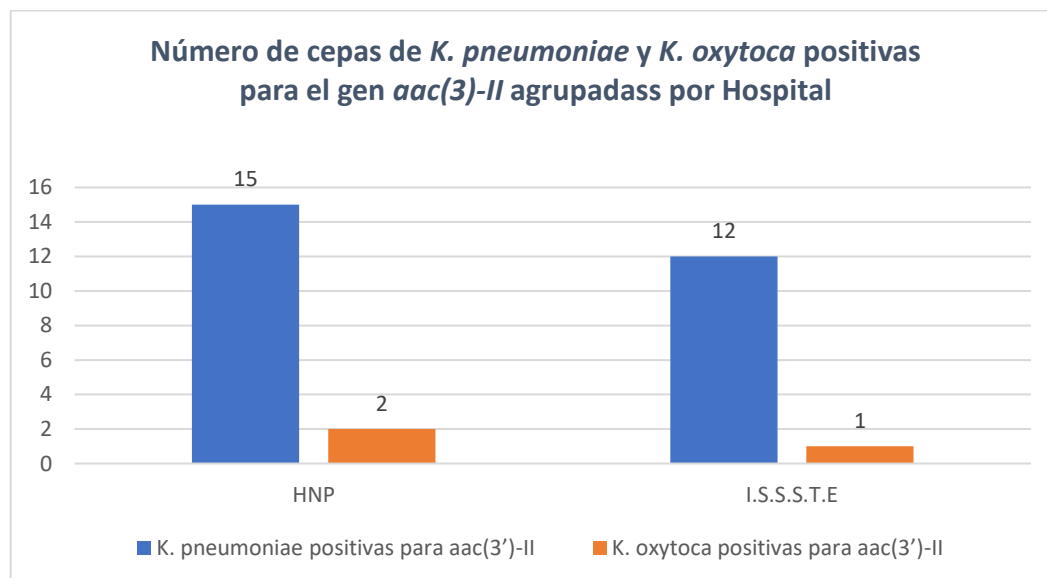


Gráfica 6. Presencia del gen de resistencia *aac(3)-II* en las cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. Azul claro: cepas de *K. pneumoniae* positivas al gen *aac(3)-Ib* ($n=27$), Naranja: cepas de *K. pneumoniae* negativas para *aac(3)-Ib* ($n=2$); Azul marino: cepas de *K. oxytoca* positivas para *aac(3)-Ib* ($n=3$).

De las 22 cepas de *K. pneumoniae* positivas para *aac(6')-Ib*, 15 provienen del Hospital para el Niño Poblano, y 7 del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla. Por otro lado, las tres cepas de *K. oxytoca* positivas para *aac(6')-Ib* se distribuyen en dos cepas provenientes del Hospital para el Niño Poblano y una del Hospital Regional I.S.S.S.T.E (**Gráfica 7**). Mientras que para *aac(3)-II*, de las 27 cepas positivas, 15 cepas de *K. pneumoniae* son del Hospital para el Niño Poblano y 12 cepas de *K. pneumoniae* del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, para *K. oxytoca*, 2 cepas provienen del Hospital para el Niño Poblano y 1 del Hospital regional I.S.S.S.T.E (**figura 8**)



Gráfica 7. Número de cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* positivas para el gen *aac(6')-Ib* agrupadas por hospital. Izquierda: cepas del Hospital para el Niño Poblano (HNP), derecha: Cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, Azul: Cepas de *K. pneumoniae* positivas al gen *aac(6')-Ib*; Naranja: Cepas de *K. oxytoca* positivas al gen *aac(6')-Ib*



Gráfica 8. Número de cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* positivas a *aac(3)-II*. Izquierda: cepas del Hospital para el Niño Poblano (HNP), derecha: Cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, Azul: Cepas de *K. pneumoniae* positivas al ger *aac(3)-II*; Naranja: Cepas de *K. oxytoca* positivas al gen *aac(3)-II*.

Detección de genes de resistencia a quinolonas.

Para la búsqueda del gen de resistencia a quinolonas *qnrB*, se emplearon un total de 31 cepas, 30 cepas de *K. pneumoniae* y 1 cepas de *K. oxytoca* del Hospital para el Niño Poblano, y 22 cepas *K. pneumoniae* del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, teniendo un total de 53 cepas. El tamaño del amplificado esperado fue de 264 pb. Para la búsqueda del gen *qnrA*, se seleccionaron 9 cepas en las que no se detectó el gen *qnrB*.

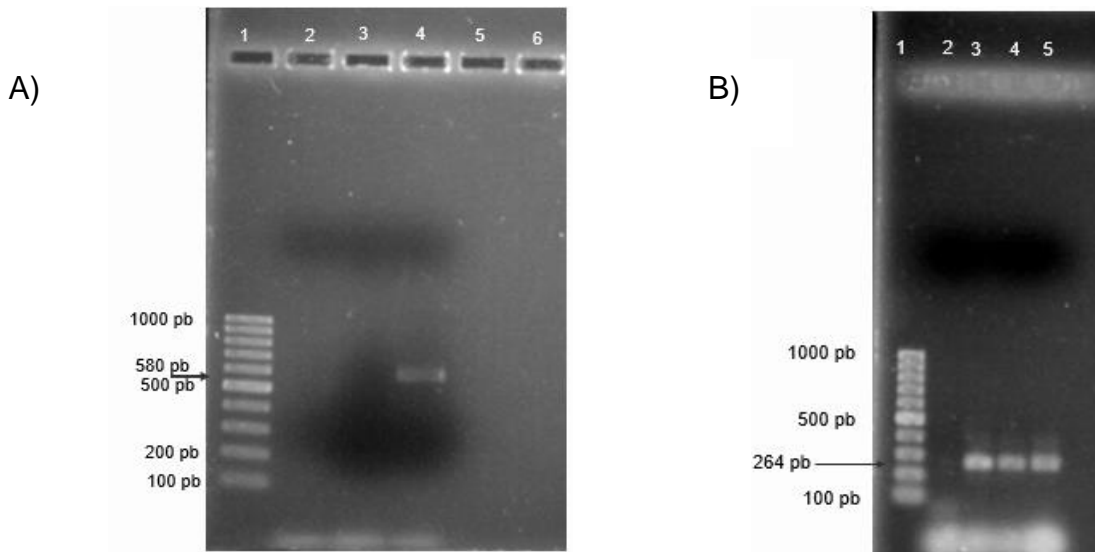
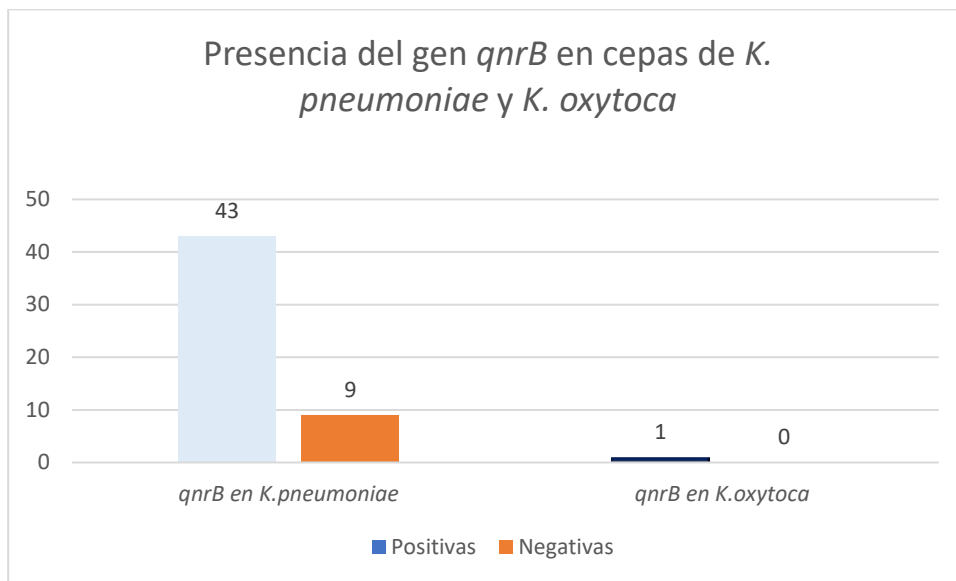


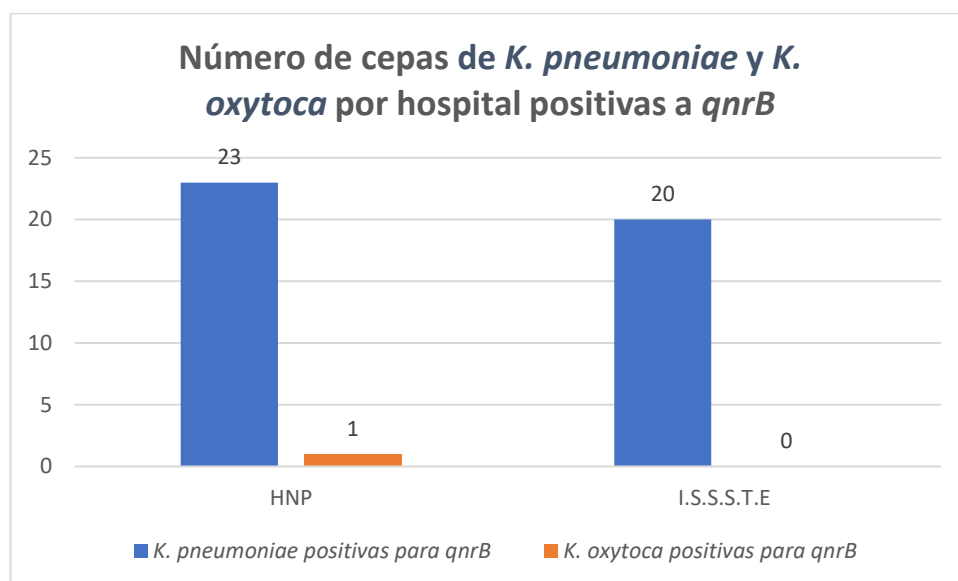
Figura 4. Detección de los genes de resistencia *qnrA* (580 pb) y *qnrB* (264 pb)
A) *qnrA*, Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: Blanco, Carril 3: sin muestra, carril 4: control positivo *E. coli* CUA 44, carril 5 y 6: KpNP1 y KpNP 6, respectivamente. B) *qnrB*, CARRIL 1: marcador de peso molecular, Carril 2: Blanco, Carril 3 y 4: control positivo *K.pneumoniae* KpS2, carril 5: KpNP 2.

El 83% (43/52) de las cepas de *K. pneumoniae* fueron positivas para *qnrB*. La búsqueda del gen *qnrA* se realizó en las 9 cepas que resultaron negativas para *qnrB*, las cuales ni una presento el gen *qnrA*. En cuanto a la única cepa de *K. oxytoca* evaluada, resultó positivo al gen *qnrB* y negativa al gen *qnrA* (**Gráfico 9, Anexo 3**).



Gráfica 9. Número de cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* positivas al gen de resistencia *qnrB*. Azul claro: cepas positivas a *qnrB* en *K. pneumoniae* (n=43). Naranja: cepas de *K.pneumoniae* negativas a *qnrB* (n=9) Azul marino: *qnrB* positivo en cepas de *K. oxytoca* (n=9).

De las 43 cepas de *K. pneumoniae* positivas para el gen *qnrB*, 23 cepas provienen del Hospital para el Niño Poblano y 20 del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla. La única cepa de *K. oxytoca* positiva para *qnrB* proviene del Hospital para el Niño Poblano (**Gráfico 10**). Por otro lado, ninguna de las 9 cepas analizadas para la búsqueda del gen *qnrA* resultó positiva, de estas, 7 cepas procedían del Hospital para el Niño Poblano y 2 cepas del Hospital Regional I.S.S.S.TE de Puebla.



Gráfica 10. Número de cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* positivas a *qnrB*. Izquierda: cepas del Hospital para el Niño Poblano (HNP), derecha: Cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, Azul: Cepas de *K. pneumoniae* positivas al gen *qnrB*; Naranja: Cepas de *K. oxytoca* positivas al gen *qnrB*

Determinación de la relación clonal de las cepas de *K. pneumoniae* del Hospital para el Niño Poblano.

Para determinar si las cepas circulantes en el Hospital para el Niño Poblano se encontraban relacionadas genéticamente se analizaron 29 cepas de *K. pneumoniae* mediante PFGE-Xba1. las imágenes obtenidas de los patrones de restricción se analizaron para elaborar matrices de similitud. Posteriormente, se construyó un dendrograma utilizando el programa NTSYSpc 2.21q, basado en el coeficiente de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages).

El análisis de la macrorestricción y los fragmentos generados resultaron en 28 patrones de bandeo diferentes (PT2 a PT29) para las cepas de *K. pneumoniae*; PT1 corresponde a la cepa control incluida en el análisis. Dentro del dendrograma, dos cepas (KpNP 17 y KpNP 18), que fueron aisladas de la misma paciente, se agruparon en el grupo A, con una similitud genotípica del 85% (índice de similitud de Dice $\geq 85\%$), lo cual nos sugiere que están estrechamente relacionadas, de acuerdo con los criterios de Tenover et al., 1995. Los aislamientos restantes que se encuentran en el dendrograma, con coeficiente de Dice menor de 0.85, fueron definidos como genéticamente no relacionadas.

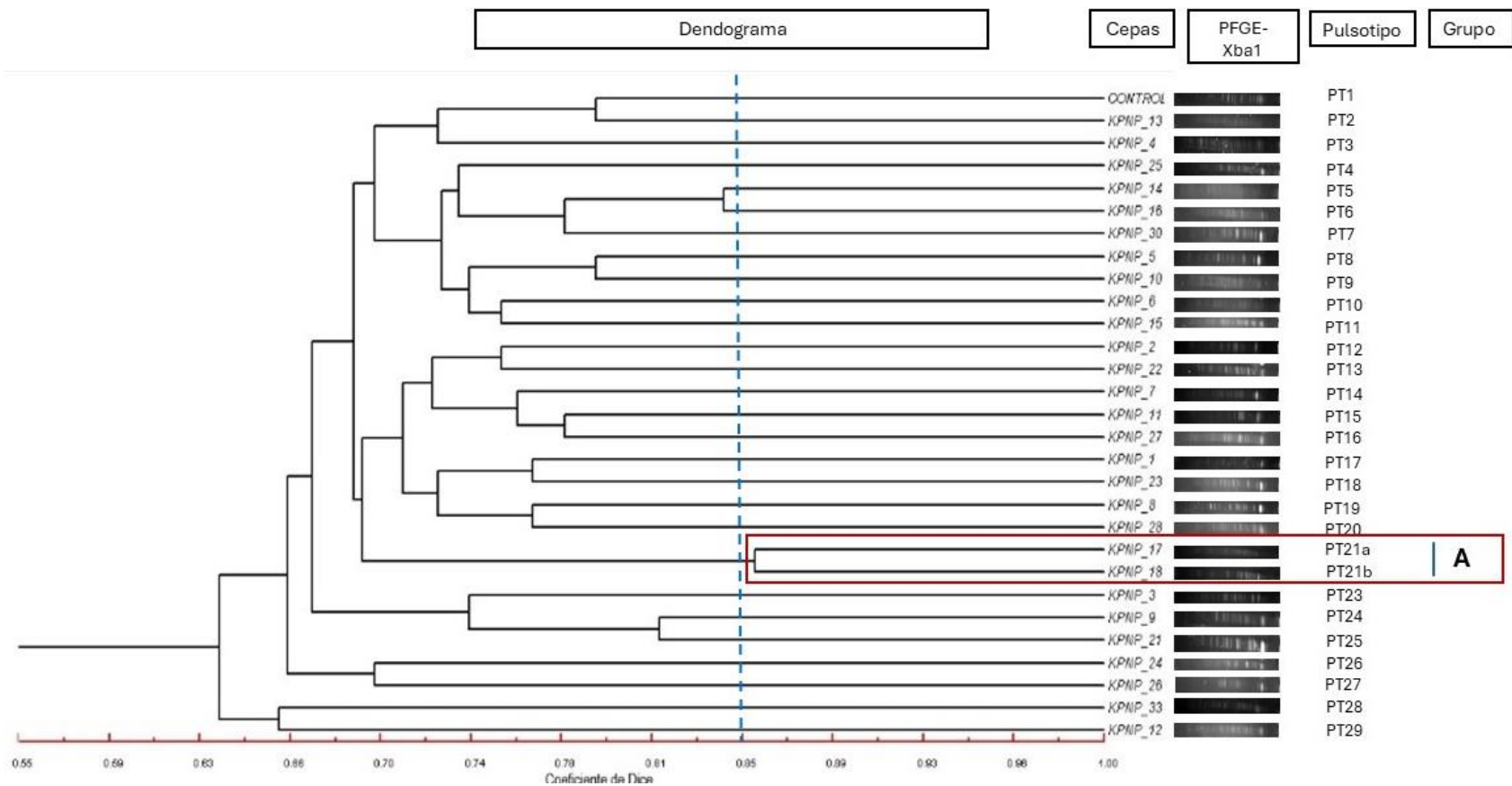


Figura 5. Dendrograma UPGMA y PFGE de los patrones de restricción obtenidos de la digestión con la enzima Xba1, de 29 cepas de *K. pneumoniae* del Hospital para el Niño Poblano. Clasificación basada en el análisis de agrupación utilizando el coeficiente de similitud de dice (valor >80%) de acuerdo con los criterios de Tenover. *et al.*, 1995

DISCUSIÓN

El género *Klebsiella* spp. pertenece a patógenos nosocomiales oportunistas de gran importancia, debido a su capacidad para presentar resistencia a múltiples antibióticos y su capacidad para causar una variedad de infecciones, desde neumonía hasta bacteriemias en pacientes inmunocomprometidos o expuestos frecuentemente a la atención médica. *Klebsiella* spp. es un patógeno emergente que ha incrementado su incidencia en las infecciones asociadas a la atención de la salud (Li *et al.*, 2023). De hecho en el 2023 la RHOVE reportó que dentro de los 5 principales microorganismos causantes de las IAAS (Infecciones asociadas a las atención de la salud) se encontraba *K. pneumoniae*.

En el presente estudio se incluyeron un total de 55 cepas de *Klebsiella* spp., de las cuales 30 correspondieron a *K. pneumoniae* y 2 a *K. oxytoca* recuperadas de niños hospitalizados en diferentes áreas del Hospital para el Niño Poblano (HNP). Esta distribución resultó en una proporción de 15:1 de *K. pneumoniae* en comparación con *K. oxytoca*. En el Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, se recolectaron 22 cepas de *K.pneumoniae* y 1 *K. oxytoca*, con una proporción de 22:1. Estos hallazgos confirman una mayor prevalencia de *K.penumoniae* en comparación con *K. oxytoca*, como se ha observado en estudios anteriores.

En comparación con un estudio previo realizado por Pérez–Sánchez, en 2020 en las mismas instituciones, se observaron diferencias notables antes como durante la pandemia de COVID-19. Del HNP se recolectaron solo 3 cepas de *K. pneumoniae* en los años 2014-2015, mientras que en nuestro estudio se obtuvieron 21 cepas durante los años previos a la pandemia (2018-2019). Sin embargo, durante la pandemia (2020-2021), el número de aislamientos disminuyó a 11 cepas. En el Hospital Regional I.S.S.S.T.E se recolectaron 60 cepas (56 cepas de *K. pneumoniae* y 4 de *K. oxytoca*) recolectadas entre 2016 y 2018, con una proporción 14:1, mientras que en nuestro estudio registro 23 cepas (22 de *K. pneumoniae* y 1 de *K. oxytoca*) entre 2021 y 2022.

Durante los años 2020 y 2021, muchos hospitales enfrentaron una sobrecarga de pacientes con COVID-19, lo que probablemente redujo la capacidad para diagnosticar y recolectar muestras de infecciones no relacionadas, esto se ve reflejado en el Hospital para el Niño Poblano, donde se observa una disminución en el número de aislamientos en 2020 y 2021 (4 y 5 cepas respectivamente) respecto a años anteriores. En contraste, el Hospital Regional I.S.S.S.T.E reportó un mayor número de aislamientos en 2021, con 22 cepas de *K. pneumoniae* y 1 de *K. oxytoca*. sin embargo, esta cifra fue menor en comparación con los resultados obtenidos por Pérez-Sánchez en 2020 en el mismo hospital entre 2016 y 2018. En el trabajo de Rath y Padhy (2014), la proporción fue de 1.54:1, mientras que en el estudio de Abdullah *et al.*, (2015) fue de 1.04:1, mostrando proporciones casi iguales de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. En

contraste, el estudio de Chakraborty et al., (2016) reportó una proporción de 9:1, indicando una mayor predominancia de *K. pneumoniae*.

La diferencia entre las proporciones de nuestro estudio con los de estudios internacionales podría estar influenciada por la cantidad de cepas analizadas en cada uno de estos, así como que no son muestras consecutivas (Abdul Rahim et al., 2015; Chakraborty, 2016). Aun así, nuestros resultados confirman que *K. pneumoniae* fue significativamente más frecuente que *K. oxytoca* como patógeno causante de infecciones clínicas en humanos dentro de las cepas analizadas, destacándose como un agente prevalente en el entorno hospitalario, tanto antes como durante la pandemia de COVID-19.

En cuanto a los servicios hospitalarios donde se aislaron más cepas de *Klebsiella spp*, destacan la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN), urgencia (U) y Cirugía (CX), esto datos son similares con los que se han registrado en México y el mundo (Afsharipour et al., 2022; Sánchez-Álvarez et al., 2022).

Por otro lado al realizar el perfil de sensibilidad a los antibióticos de las cepas del Hospital para el Niño Poblano, los resultados revelan un 80% de resistencia promedio en las cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* frente a los diferentes grupos de antibióticos evaluados en las cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, destacando niveles críticos en β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas, lo que plantea una importante preocupación clínica para el tratamiento de infecciones provocadas por este patógeno.

Para el grupo de los β -lactámicos e inhibidores de β -lactamasas, el 93% de las cepas de *K. pneumoniae* demostró resistencia a amoxicilina- ácido clavulánico y el 95% a ticarcilina- ácido clavulánico. Estas combinaciones de antibióticos son ampliamente usadas por su amplio espectro de actividad, sin embargo, actualmente han demostrado una reducción de eficacia, hallazgo que concuerda con estudios como el de Sharma et al., al 2023, donde de 40 cepas de *K. pneumoniae* el 90 % fue resistente a amoxicilina/ácido clavulánico, y en el de Enjema et al., 2021, el cual reportó resistencia del 86% y 83.6% ,respectivamente. Comparando con el estudio de Pérez-Sánchez (2020), que analizó solo tres cepas recolectadas antes de la pandemia de COVID-19 en la misma institución, el 67% (2/3) de las cepas fueron resistencia a amoxicilina- ac. clavulánico, un porcentaje menor que el observado en este estudio. Esta diferencia podría deberse al reducido tamaño de muestra en el estudio previo y al incremento en la presión selectiva por el mayor uso de antibióticos durante la pandemia.

Respecto a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación, todas las cepas (100%) fueron resistentes a ceftriaxona, el 97% a ceftazidima y el 93% a cefepime. Estos resultados podrían estar relacionado con el alto porcentaje de cepas productoras de

β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), detectadas en el 87% de cepas de *K. pneumoniae* en este estudio. En cambio, se observó un menor porcentaje de resistencia para cefoxitina, con solo un 17% de las cepas de *K. pneumoniae*, además, en nuestro estudio no se identificaron cepas que presentaran el fenotipo AmpC, que generalmente confieren resistencia a este tipo de antibióticos. Comparando con Pérez - Sánchez (2020), donde las tres cepas analizadas presentaron resistencias del 67% a cefazolina, 33% a ceftazidima y 33% a cefoxitina, se observan diferencias significativas atribuibles tanto al pequeño tamaño muestral como al aumento de la resistencia durante la pandemia.

En relación con los carbapenémicos, los resultados de este estudio mostraron una resistencia del 57% (17/30) a meropenem, 80% (24/30) a imipenem. Estos hallazgos son más altos en comparación con los reportados por el estudio previo Pérez-Sánchez, 2020, quien reportó que solo una de las tres cepas analizadas mostró resistencia a ambos carbapenémicos. No obstante, los altos niveles de resistencia observados siguen siendo motivos de preocupación, ya que los carbapenémicos son considerados el tratamiento de última línea en infecciones graves. Es importante determinar a que se debe esta resistencia y determinar los niveles de CMI en estudios posteriores.

Respecto a otros antibióticos, se observó una alta tasa de resistencia a las tetraciclinas, con un 80% de las cepas resistentes, teniendo un aumento elevado a este antibiótico, esto concuerda con otros estudios realizados, donde se notifica que la resistencia a este antibiótico ha aumentado a lo largo de los años. Al ser un antibiótico de amplio espectro limita su uso en el tratamiento de infecciones. Por otro lado, la resistencia al cloranfenicol fue baja, con solo un 7% de las cepas mostrando resistencia. aunque el cloranfenicol no se utiliza como tratamiento de primera línea en infecciones graves por *K. pneumoniae*, su alta tasa de sensibilidad en la mayoría de las cepas lo puede convertir en opción a considerar en algunos contextos específicos, especialmente en infecciones graves como meningitis causadas por cepas resistentes a múltiples fármacos (MDR), sin embargo su uso aún está restringido (Rahim *et al.*, 2015). En comparación, el estudio de Pérez-Sánchez, 2020 se reportó resistencia a tetraciclinas en una de tres cepas y ninguna a cloranfenicol, resaltando nuevamente las diferencias atribuibles al tamaño muestral reducido y al impacto de la pandemia en la diseminación de resistencia.

De las 2 cepas de *K. oxytoca*, KpNP 29 se clasificó como MDR, presentando resistencia en penicilinas con inhibidores de β -lactamasas (AMC, TIM), cefalosporinas (CRO, CAZ), aminoglucósidos (AN, NN), quinolonas (CIP), sulfonamidas (SXT), notando que presenta resistencia a más de tres familias diferentes, estos resultados

nos sugieren presencia de varios mecanismos de resistencia. De acuerdo con los resultados, esta cepa presentó el fenotipo BLEE, lo cual concuerda con la resistencia que tiene a cefalosporinas, sin embargo, se tendrían que realizar más estudios para conocer genotípicamente los mecanismos y enzimas involucrados. En el caso KpNP 31, se clasifica como XDR, al presentar resistencia en todas las categorías excepto dos o menos. Esta cepa presentó resistencia en penicilinas con inhibidores de β -lactamasas (AMC, TIM), cefalosporinas (FOX, CRO, CAZ, FEP), carbapenémicos (IMP), tetraciclinas (Te), aminoglucósidos (AN, GEN, NN), quinolonas (CIP, LVX, NOR), fenicoles (CL). Al presentar una resistencia a múltiples familias de antibióticos, nos plantea un gran riesgo a la salud pública, esta cepa no presentó el fenotipo BLEE, sin embargo la cepa podría tener otras BLEE que no son detectadas por el método utilizado en este estudio. Además, podrían estar involucrados otros mecanismos de resistencia, tales como modificaciones en las proteínas de unión a penicilina (PBP's), bombas de expulsión o alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa, que contribuyen a este perfil de resistencia y deben ser investigados (Li et al., 2023).

Los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos ampliamente utilizados en el tratamiento de diversas infecciones bacterianas, especialmente aquellas causadas por bacterias Gramnegativas, como *Klebsiella* spp. Dentro de este grupo, los antibióticos, amikacina, gentamicina y tobramicina, son los que se prescriben con mayor frecuencia (Foudraine et al., 2021).

En este estudio, al realizar el Kirby-Bauer, se observó una alta tasa de resistencia a los aminoglucósidos, en las cepas de *K. pneumoniae* del Hospital para el Niño Poblano revelaron que el 100% (30/30) fue resistente a amikacina, 83% (25/30) a gentamicina, 93% (28/30) a tobramicina.

Estos resultados reflejan un panorama preocupante en el contexto local, ya que limitan las opciones terapéuticas para infecciones graves por *K. pneumoniae*. En comparación, en el Hospital I.S.S.S.T.E, las tasas de resistencia a aminoglucósidos fueron menores que las observadas en este estudio, el 36% (8/22) de las cepas fueron resistentes a amikacina, el 45% (10/22) a gentamicina y el 59% (13/22) a tobramicina. Estas diferencias podrían deberse a varios factores, como las prácticas de prescripción de antibióticos, el control de infecciones y el tipo de población atendida en cada institución, además, también podría estar relacionadas con las características de las cepas circulantes.

Los resultados obtenidos en este estudio son consistentes con estudios internacionales, por ejemplo, en el 2023, se reportó en Arabia Saudita, que el 100% (51/51) de las cepas analizadas fueron resistentes a la amikacina, para gentamicina el 98% (50/51) y el 98% (50/51) a la tobramicina (Ahmed et al., 2023). De manera similar, en Iran por Azimi et al., 2024 mostró una alta tasas de resistencia a gentamicina

93,6% (131/144), tobramicina 86,4%(121/144), sin embargo para la amikacina la resistencia fue menor 60% (60/144) (Leila Azimi et al., 2024). Estas cifras confirman una preocupante tendencia global de aumento en la resistencia a aminoglucósidos en *K. pneumoniae*.

Al comparar con datos locales previos, el estudio de Pérez- Sánchez, 2020, realizado con tres cepas recolectadas antes de la pandemia de COVID-19 en el mismo Hospital, ninguna cepa presentó resistencia a amikacina, ni a gentamicina y solo dos presentaron resistencia a tobramicina. Esta diferencia podría explicarse por el reducido número de cepas analizadas y por el impacto de la pandemia, que probablemente incremento la presión selectiva debido al uso indiscriminado de antibióticos, favoreciendo la propagación de cepas resistentes.

En el caso de las dos cepas de *K. oxytoca*, KpNP29 y KpNP31, ambas fueron resistentes a amikacina y tobramicina, mientras que KpNP29 presentó resistencia intermedia a gentamicina y KpNP31 fue resistente a este último antibiótico. Estos resultados difieren con algunos estudios previos, en los que las cepas de *K. oxytoca* fueron sensibles a amikacina y gentamicina, se han reportado casos de resistencia a tobramicina. lo que sugiere que este último antibiótico podría estar perdiendo efectividad frente a *K. oxytoca* en diversos lugares (AL-Khikani et al., 2020).

El hecho de que las cepas analizadas sean resistentes a la mayoría de los aminoglucósidos probados y, que son los más utilizados en la práctica clínica, compromete seriamente su eficacia como opciones de terapéutica.

Además en este estudio, las cepas de *K. pneumoniae* presentaron altos niveles de resistencia a las quinolonas, el 100% (30/30) de las cepas presentó resistencia a ciprofloxacino, el 83%(25/30) a levofloxacino y 73% (22/30) a norfloxacino. Estos resultados contrastan con los reportados por Pérez- Sánchez, 2020, quien analizó tres cepas recolectadas de la misma institución antes de la pandemia de COVID-19, de las cuales solo una presentó resistencia a los tres antibióticos probados. Esta discrepancia puede atribuirse a varios factores, como el incremento de la presión selectiva derivada del uso intensivo de antimicrobianos durante la pandemia, que probablemente favoreció la diseminación de cepas resistentes. Además, el reducido número de cepas analizadas en el estudio previo limita la posibilidad de obtener una representación precisa de los niveles de resistencia en ese momento.

Por otro lado, las dos cepas de *K. oxytoca* también presentaron resistencia a ciprofloxacino, y solo una a levofloxacino y norfloxacino. Estos resultados concuerdan con los presentados en otro estudio en donde se analizaron 2 cepas, las cuales las dos presentaron resistencia a ciprofloxacino y levofloxacino (Tohamy et al., 2018). Esta consistencia en los datos sugiere una tendencia en la resistencia de *K. oxytoca* hacia las quinolonas en diferentes contextos geográficos.

La alta resistencia observada en *Klebsiella spp.* a esta clase de antibióticos representa un desafío clínico importante. Dado que las quinolonas son frecuentemente empleadas en el tratamiento de infecciones graves, su disminuida efectividad podría limitar las opciones terapéuticas disponibles (Bush *et al.*, 2020).

Por otra parte, la importancia de este estudio se basa en analizar la resistencia a quinolonas y aminoglucósidos para lo cual se incluyeron, además de las 30 cepas de *K. pneumoniae* y 2 cepas de *K. oxytoca* del Hospital para el Niño Poblano, 22 cepas de *K. pneumoniae* y 1 cepa de *K. oxytoca* aisladas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, a las cuales se les realizó la CMI y búsqueda de genes de resistencia de estas familias de antibióticos. Se realizó la CMI para amikacina en las cepas que presentaron resistencia por Kirby-Bauer, lo que nos permitió conocer la concentración exacta del antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano, lo que nos proporcionó información más detallada.

Al realizar la CMI para amikacina en las cepas del Hospital para el Niño Poblano, se encontró que solo 6 cepas de las 30 de *K. pneumoniae* y las 2 cepas de *K. oxytoca* presentaron resistencia acorde a los puntos de corte establecidos. Estos hallazgos indican que el método de Kirby-Bauer clasificó incorrectamente en un número significativo de cepas de *K. pneumoniae*, destacando la importancia de confirmar los resultados mediante la determinación de CMI. En el caso de las cepas del hospital regional I.S.S.S.T.E de Puebla, se evaluaron 15 cepas de *K. pneumoniae* y 1 cepa de *K. oxytoca*, seleccionadas previamente por el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, divididas en dos grupos: 8 cepas resistentes y 7 cepas intermedias de *K. pneumoniae* y la cepa de *K. oxytoca* intermedia. Los resultados de la CMI mostraron que de las 8 cepas inicialmente clasificadas como resistentes, solo 6 fueron clasificadas como resistentes, de las 7 que inicialmente eran intermedias, solo 2 se mantuvieron en dicha categoría, mientras que 2 fueron reclasificadas como resistentes, y la única cepa de *K. oxytoca* al realizar la CMI confirmó que se encontraba como intermedia. Aunque también se observó diferencia, hubo mayor concordancia entre ambos métodos en el hospital regional I.S.S.S.T.E en comparación con el Hospital para el Niño Poblano. La discrepancia podría explicarse en parte porque el método de Kirby-Bauer es cualitativo y depende de la interpretación visual de los halos de inhibición, lo cual puede verse influido por factores técnicos como la concentración inicial del antibiótico en el disco y la precisión en la medición de los halos. Esto puede dar lugar a errores que, aunque menores, pueden alterar la categorización de resistencia, subrayando la necesidad de métodos cuantitativos como la CMI. Además, las cepas podrían presentar variabilidad en los mecanismos de resistencia, lo que influye en su fenotipo de resistencia y en cómo responden a los antibióticos. Además, las características del entorno de cada hospital, como el uso de antibióticos y las

prácticas de tratamiento, pueden generar una presión selectiva diferente sobre las cepas.

Al comparar los resultados obtenidos con estudios previos, se encuentra que Mustafa *et al.*, 2020 reportó una tasa de resistencia del 42% en aislamientos de *Klebsiella* spp., con valores de CMI ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$. En México, un estudio de 2012 reportó una resistencia a la amikacina del 13,1 % en un rango de CMI superiores a 32 $\mu\text{g/ml}$, lo que se asemeja más a los valores observados en las cepas analizadas y reflejando posiblemente diferencias en la presión selectiva por uso de antibióticos a nivel regional (Morfin-Otero *et al.*, 2012). Estas variaciones entre los estudios refuerzan la importancia de realizar investigaciones locales para identificar patrones de resistencia específicos de la región, ayudando a ajustar los protocolos de vigilancia epidemiológica y mejorar las políticas de uso de antibióticos en hospitales locales.

En cuanto a la determinación de la CMI para las quinolonas, específicamente norfloxacino y ciprofloxacino, se observaron diferencias significativas en la resistencia bacteriana cuando se compararon los resultados obtenidos por el método de Kirby-Bauer y la CMI.

En el Hospital Regional I.S.S.S.T.E de Puebla, la comparación entre Kirby-Bauer y la CMI fue total (100%) para las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacino y casi completa para norfloxacino, donde 12 de las 14 (86%) cepas confirmaron resistencia por ambos métodos. Estos hallazgos sugieren que la resistencia a las quinolonas se encuentra en niveles altos, lo que se refleja en los valores de CMI consistentemente altos (por ejemplo, ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ y >128 $\mu\text{g/ml}$) observados en estas cepas. En contraste, en el Hospital para el Niño Poblano, Kirby-Bauer clasificó al 100% de las cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* como resistentes a ciprofloxacino, sin embargo, la CMI reveló que solo el 88% de *K. pneumoniae* y ninguna cepa de *K. oxytoca* mantenían esa clasificación. Norfloxacino, presentó aún mayores discrepancias, donde de las 23 cepas clasificadas como resistentes por Kirby-Bauer, solo 4 (3 de *K. pneumoniae* y 1 de *K. oxytoca*) confirmaron la resistencia mediante CMI, mientras que el resto fue reclasificado como intermedio o sensible.

En estudios internacionales, por ejemplo, en Irán, se analizaron 92 cepas de *K. pneumoniae* encontrándose que, solo 20 aislamientos resultaron no sensibles a ciprofloxacino, solo 15 cepas mantuvieron esa resistencia según CMI en rangos de 6-128 $\mu\text{g/ml}$, mientras que cinco fueron reclasificadas como intermedia con CMI de 1.5-3 $\mu\text{g/ml}$ (Jomehzadeh *et al.*, 2022). Esta diferencia en los rangos de CMI sugiere una presión selectiva antibiótica más intensa o la presencia de mecanismos de resistencia más variados en las cepas locales. Entre estos mecanismos, podrían o están involucrados la presencia de genes de resistencia como *qnr*, que no fueron analizados en este estudio, mutaciones en las topoisomerasas (*gyrA* y *parC*), bombas de

expulsión (oqxAB y quepa) y alteración en la permeabilidad en la membrana externa. Esto resalta la necesidad de realizar estudios genotípicos adicionales para tener una mejor caracterización e identificación de los mecanismos de resistencia en las cepas de *K. pneumoniae* analizadas en este estudio (Correia et al., 2017).

Asimismo, un estudio europeo encontró que el 12% de los aislamientos de *K. pneumoniae* (10 de 84 cepas) mostraron sensibilidad reducida a norfloxacino con CMI ≥ 2 mg/l (Rydberg et al., 1994). En contraste, en las cepas locales, los valores de CMI para norfloxacino fueron considerablemente altos en la mayoría de las cepas del Hospital Regional I.S.S.S.T.E. Estas diferencias podrían estar relacionadas con variaciones regionales en el uso de quinolonas, la presión antibiótica en los hospitales o la diversidad genética de las cepas.

Además, mientras que en los estudios internacionales se reporta una menor proporción de cepas con resistencia intermedia o sensibilidad reducida, las cepas locales presentan una distribución marcada, con la mayoría de los aislamientos categorizados como altamente resistentes acorde a los valores de CMI. Esto podría estar indicando que las cepas circulantes en los hospitales analizados presentan más de un mecanismo de resistencia.

La CMI es esencial para obtener datos más certeros de la resistencia en los antibióticos, facilitando decisiones sobre los tratamientos y mejorar las políticas de uso de antibióticos en cada hospital.

Con respecto a los genes relacionados con la resistencia a aminoglucósidos, en este estudio, en el Hospital I.S.S.S.T.E, el gen *aac(6')-Ib* se detectó en el 58% de las cepas de *K. pneumoniae* y en una cepa de *K. oxytoca* que se clasificaron como resistencia e intermedia, mientras que en el Hospital para el Niño Poblano este gen se identificó en el 88% de las cepas de *K. pneumoniae* y las dos cepas de *K. oxytoca*. Por otro lado, el gen *aac(3)-II* se detectó en el 100% de las cepas de *K. pneumoniae* y en la cepa de *K. oxytoca* del Hospital I.S.S.S.T.E. mientras que en el Hospital para el Niño Poblano se identificó en el 88% de las cepas de *K. pneumoniae* y en las dos cepas de *K. oxytoca*.

La prevalencia de estos genes se comparó con estudios previos realizados en diferentes regiones. Por ejemplo, en un estudio realizado en Egipto, los genes *aac(3)-II* y *aac(6')-Ib* se detectaron en 58% y 88% de los aislados, respectivamente (El-Badawy et al., 2017). En México, el estudio realizado por Flores-Percino, 2022, reportó que los genes *aac(3)-II* fueron identificados en 74.6% de las cepas y el gen *aac(6')-Ib* en el 80.9%, lo que destaca que la resistencia a aminoglucósidos es un problema emergente en el país y que podría estar en aumento. Diversos estudios coinciden en que estos genes son los más frecuentes en *Klebsiella* spp. En Turquía, se observó que la resistencia a los aminoglucósidos en aislados clínicos de *E. coli* y *K. pneumoniae* es causada predominantemente por las enzimas *aac(6')-Ib* y *aac(3)-II* (Cirit et al., 2019).

Así mismo, en Noruega, estos genes se identificaron como los principales causantes de resistencia a aminoglucósidos en *Klebsiella* spp. en muestras clínicas en los aislados clínicos de *E. coli* y *Klebsiella* spp. es causada predominantemente por las enzimas modificadoras de aminoglucósidos: *aac(3)-II* y *aac(6')-Ib* (Haldorsen et al., 2014)

En este estudio, de las 22 cepas positivas a *aac(6')-Ib*, solo 14 cepas presentaron resistencia a amikacina, y solo dos cepas de *K. oxytoca*, mientras 8 cepas (7 *K. pneumoniae* y 1 *K. oxytoca*) se encontraron en el rango intermedio. Además se identificaron cinco cepas que fueron resistentes a amikacina a concentraciones ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ sin la presencia del gen *aac(6')-Ib*, el cual es uno de los principales determinantes de resistencia a este antibiótico. Esto sugiere la posible intervención de otros mecanismos de resistencia, como la presencia de genes alternativos a *aac(6')-Ib*, como la acetiltransferasa *aph(3')-IIIa* o del tipo nucleotidiltransferasa, como *ant(4)-Ia* (Nasiri et al., 2018), o la presencia de bombas de expulsión o mutaciones en porinas, así como mutaciones en la subunidad 16S en los ribosomas bacterianos pondrían contribuir a la resistencia en aminoglucósidos, estos mecanismos resaltan la necesidad de una investigación de otros factores genéticos y moleculares para comprender mejor los mecanismos de resistencia en *Klebsiella* spp (Navon-Venezia et al., 2017).

Con respecto a los genes plasmídicos relacionados con la resistencia a quinolonas, en este estudio, se observó una prevalencia notable del gen *qnrB* en cepas resistentes a quinolonas tanto de *K. pneumoniae* como *K. oxytoca*. En el Hospital I.S.S.S.T.E , el gen *qnrB* se detectó en el 91% de las cepas, mientras que en el Hospital para el Niño Poblano este gen solo se identificó en el 77% de las cepas de *K. pneumoniae* y en una cepa de *K. oxytoca*. Por otro lado, el gen *qnrA* no se encontró en ninguna cepa analizada. Este hallazgo es consistente con estudios previos, que muestran a *qnrB* como el gen de resistencia a quinolonas más prevalente en *Klebsiella* spp. y otras enterobacterias. Por ejemplo, el estudio realizado por El-Badawy et al., 2017 mostró que *qnrB* estaba presente en el 74% de los aislados(42/57), siendo el más frecuente, mientras que no se detectó *qnrA* en ninguna de las cepas evaluadas, en otro estudio, también *qnrB* estuvo dentro de los genes más prevalentes, en cambio *qnrA* no se encontró en ningún aislado (El-Badawy et al., 2017; Samer Swedan et al., 2023). En este estudio nueve cepas no presentaron ninguno de los dos genes buscados (*qnrA* y *qnrB*), lo que sugiere la posible participación de otros mecanismos implicados en la resistencia a quinolonas.

Estudios realizados en Latinoamérica han identificado otros genes relacionados con esta resistencia, como *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *quepA* y *oqxB*, además de mutaciones en genes *gyA* y *parC*.

Al analizar las CMI para quinolonas y aminoglucósidos, junto con la detección de los genes de resistencia en las cepas, se observó que no siempre existe una correlación

directa entre ambos. En el caso de los aminoglucósidos, por ejemplo, se identificaron cinco cepas con valores de CMI ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ para amikacina, pero sin la presencia del gen *aac(6')-Ib*, lo que sugiere la posible participación de mecanismos de resistencia alternativos, como los genes que codifican metilasas del ARN 16S (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* y *rmtD*), los cuales han sido asociados previamente con valores elevados de CMI. Estudios previos han reportado que estas metilasas, en combinación con enzimas modificadoras de aminoglucósidos, contribuyen significativamente a la resistencia en bacterias Gramnegativas (Permatasari *et al.*, 2023).

Por otro lado, 14 cepas se clasificaron como intermedias para amikacina, con valores de CMI de 8 $\mu\text{g/ml}$, presentando tanto los genes *aac(6')-Ib* como *aac(3')-II*. Esto sugiere que, aunque la presencia de estos genes puede conferir cierta resistencia, no siempre se correlaciona con niveles altos de CMI, además de que otros mecanismos podrían estar interfiriendo el fenotipo observado.

En cuanto a las quinolonas, se identificaron cinco cepas con valores de CMI que oscilaban entre 1 y 16 $\mu\text{g/ml}$, y una cepa con CMI >128 $\mu\text{g/ml}$, sin embargo, estas cepas no presentaron el gen *qnrB*, que confiere resistencia a este grupo de antibióticos. Esto indica la posible participación de mecanismos adicionales, como mutaciones en las topoisomerasas (*gyrA* y *parC*) o la acción de bombas de eflujo.

Además, el gen *aac(6')-Ib-cr*, una variante del gen *aac(6')-Ib*, podría estar involucrado en la resistencia observada tanto en aminoglucósidos como en quinolonas. Este gen codifica una enzima acetiltransferasa que, además de inactivar aminoglucósidos, tiene la capacidad de modificar quinolonas como ciprofloxacino, reduciendo su eficacia. En este estudio, cepas con CMI elevadas a ciprofloxacino (entre 8 y >128 $\mu\text{g/ml}$) y amikacina (>128 $\mu\text{g/ml}$) podrían estar implicando la presencia de *aac(6')-Ib-cr* como un factor adicional. Estudios previos han señalado que esta variante puede contribuir a la resistencia cruzada entre ambos grupos de antibióticos, lo que explicaría los altos valores de CMI incluso en ausencia de otros genes como *qnrB* o *aac(6')-Ib* (Eftekhari & Seyedpour, 2015; Shin *et al.*, 2009).

La alta resistencia a ciprofloxacino (valores de CMI entre 8 y >128 $\mu\text{g/ml}$ en 17 de las 52 cepas) puede estar asociada con la coexistencia del gen *qnrB* y bombas de eflujo como OqxAB y quepA, además la resistencia de alto nivel a quinolonas se considera una consecuencia de mutaciones que involucran genes cromosómicos que codifican dos enzimas, a saber, la ADN girasa (*gyrA*) y la topoisomerasa IV (*parC*). Se ha reportado cepas de *K. pneumoniae* con niveles de resistencia a ciprofloxacino que oscilaban entre 8 y 256 $\mu\text{g/ml}$ con presencia tanto del gen *qnrB* como bombas de eflujo (Dehnamaki *et al.*, 2020; Goudarzi *et al.*, 2015; Kareem *et al.*, 2021). En este estudio, algunas cepas que fueron resistentes tanto a ciprofloxacino (CMI de 64 $\mu\text{g/ml}$) como a norfloxacino (CMI >128 $\mu\text{g/ml}$), aunque presentan el gen *qnrB*, los altos valores

de CMI sugieren que mecanismos adicionales están involucrados, como mutaciones en *gyrA* y *parC*, o bombas de eflujo.

Esta diversidad de mecanismos sugiere la necesidad de realizar estudios posteriores para la búsqueda de genes o mecanismo implicados en la resistencia a quinolonas en el contexto local, con el fin de lograr una comprensión más completa. Además, es importante identificar la interacción entre los diferentes mecanismos de resistencia, para desarrollar estrategias de tratamiento más efectivas y específicas

Por último se quería conocer si las cepas de *K. pneumoniae* del Hospital para el Niño Poblano tenían relación clonal entre ellas, para lo cual se realizó PFGE-XbaI, encontrando solo un grupo con dos cepas, KpNP 17 y KpNP 18, aisladas del mismo paciente y fuente de aislamiento en diferente tiempo que presentaron un índice de similitud de Dice de >85%, indicando que están estrechamente relacionadas, de acuerdo a estos resultados, este grado de similitud sugiere que ambas cepas son la misma cepa. Ambas cepas comparten características fenotípicas y genéticas, así como el tiempo de aislamiento y la fuente, estos resultados tienen importantes implicaciones en cuanto al seguimiento del paciente, así como al control de infecciones, ya que refuerzan la necesidad de implementar medidas de vigilancia higiene y control en pacientes que portan este tipo de cepas para prevenir brotes y propagación de cepas resistentes dentro del hospital.

Este estudio también reveló una notable diversidad genética entre los aislados de *K. pneumoniae* en el entorno del Hospital para el Niño Poblano. La presencia de cepas genéticamente distintas en diversas áreas hospitalarias puede complicar la contención de brotes, ya que cepas con variabilidad genética pueden propagarse y desarrollar diferentes mecanismos de resistencia. En otros estudios se han demostrado una alta diversidad genética entre cepas aisladas en diferentes unidades, lo que sugiere que la transmisión clonal no siempre es evidente y que la adquisición de cepas resistentes puede darse de manera independiente y no de una fuente común, dificultando el manejo y control al ser cepas distintas, ya que cada cepa podría responder de manera distinta, teniendo que implementar medidas de control de manera continua, para evitar aumento en la reinfección o aparición de nuevos casos, o brotes (Elahi *et al.*, 2019; Lau *et al.*, 2021).

Conclusión

Se observó que la mayoría de las infecciones causadas por *Klebsiella* spp, en los hospitales analizados fueron producidas por *K. pneumoniae*, en comparación con *K. oxytoca*. Se observó un aumento notable en la resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos y quinolonas en las cepas recolectadas durante el periodo de la pandemia de COVID-19. Clasificándose estas cepas como pandrogo-resistentes y MDR y presentaron un fenotipo BLEE, por lo que debe de hacerse un seguimiento de dichas cepas en estos hospitales

Las cepas de *K. pneumoniae* presentaron alta resistencia a quinolonas y aminoglucósidos en ambos hospitales, con CMI altos, relacionándolas con genes como *qnrB* y *aac(3)-II* y *aac(6)-Ib* respectivamente, aunque dados los niveles altos de CMI es necesario la búsqueda de otros mecanismos involucrados.

K. oxytoca presentaron resistencia significativa a β -lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas lo cual es importante para vigilar este tipo de cepas.

Se observó una diversidad genética entre los aislamientos del Hospital para el Niño Poblano, excepto por dos cepas (KPNP 17 y KPNP 18) aisladas del mismo paciente con similitud genética alta (>85%).

Perspectivas

- Evaluar la presencia de mutaciones en las subunidades ribosomales que puede conferir resistencia a los aminoglucósidos, así como la sobreexpresión de bombas de expulsión y otras enzimas modificadoras de aminoglucósidos (*ant(2'')*-I, *ant(4')*, *aph(3')*-I), que podrían contribuir a la resistencia en cepas que no presentaron los genes evaluados.
- Evaluar la presencia de mutaciones en *gyrA* y *parC*, sobreexpresión de bombas de eflujo que determinan resistencia a quinolonas y otros determinantes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos, como *qepA*, *qnrA*, *oqxA* y *oqxB* en las cepas que presentaron CMI altas.
Realizar PFGE a cepas del Hospital I.S.S.S.T.E para relación clonal de acuerdo con los resultados de la CMI .
- Determinar el fenotipo hipermucoide.
- Buscar genes de virulencia, para determinar si las cepas con CMI alta a quinolonas y aminoglucosidos, poseen virulencia alta .

Bibliografía.

- 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(9), 2589-2597.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkv135>
- Abdulkareem, M. M., Abdulrahman, M. A., & Yassin, N. A. (2023). Molecular detection of plasmid-mediated quinolone resistance genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* during Covid-19 pandemic. *Pharmacia*, *70*(1), Article 1.
<https://doi.org/10.3897/pharmacia.70.e90610>
- Afsharipour, M., Mahmoudi, S., Raji, H., Pourakbari, B., & Mamishi, S. (2022). Three-year evaluation of the nosocomial infections in pediatrics: Bacterial and fungal profile and antimicrobial resistance pattern. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *21*, 6.
<https://doi.org/10.1186/s12941-022-00496-5>
- Ahmed, O. B., Asghar, A. H., Bamaga, M., Bahwerth, F. S., & Ibrahim, M. E. (2023). Characterization of aminoglycoside resistance genes in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* collected from tertiary hospitals during the COVID-19 pandemic. *PLOS ONE*, *18*(7), e0289359.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289359>
- AL-Khikani, F. H. O., Abadi, R. M., & Ayit, A. S. (2020). Emerging Carbapenemase *Klebsiella oxytoca* with Multidrug Resistance Implicated in Urinary Tract Infection. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, *4*(2), 148. https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_165_19

Antimicrobial resistance. (s. f.). Recuperado 4 de febrero de 2024, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Bengoechea, J. A., & Sa Pessoa, J. (2018). *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. *FEMS Microbiology Reviews*, *43*(2), 123-144.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy043>

Bush, N. G., Diez-Santos, I., Abbott, L. R., & Maxwell, A. (2020). Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules*, *25*(23), 5662.
<https://doi.org/10.3390/molecules25235662>

Carabarin Lima Alejandro, Libia León Izurieta, Rosa del Carmen Rocha Gracia, Miguel Castañeda Lucio, Carmen Torres, Zita Gutierrez Cazarez, Sirenia González Posos, Claudia F. Martínez de la Peña, Ygnacio Martinez Laguna, & Patricia Lozano Zarain. (2016, agosto 1). *First evidence of polar flagella in Klebsiella pneumoniae isolated from a patient with neonatal sepsis | Microbiology Society*. Journal of Medical Microbiology.
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.000291>

Chakraborty, S. (2016). Prevalence, antibiotic susceptibility profiles and ESBL production in *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* among hospitalized patients. *Periodicum Biologorum*, *118*(1), 53-58. <https://doi.org/10.18054/pb.2016.118.1.3160>

Cirit, O. S., Fernandez-Martinez, M., Yayla, B., & Martinez-Martinez, L. (2019). *Aminoglycoside resistance determinants in multiresistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae clinical isolates from Turkish and Syrian patients*. <http://hdl.handle.net/10668/13625>

Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J. L., & Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: Where do we stand? *Journal of Medical Microbiology*, *66*(5), 551-559.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.000475>

- Dehnamaki, M., Ghane, M., & Babaekhou, L. (2020). Detection of OqxAB and QepA Efflux Pumps and Their Association with Antibiotic Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Urinary Tract Infection. *International Journal of Infection*, 7(4). <https://doi.org/10.5812/iji.107397>
- Doi, Y., Wachino, J., & Arakawa, Y. (2016). Aminoglycoside Resistance. *Infectious disease clinics of North America*, 30(2), 523-537. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011>
- Dong, N., Yang, X., Chan, E. W.-C., Zhang, R., & Chen, S. (2022). *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *eBioMedicine*, 79. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103998>
- Eftekhari, F., & Seyedpour, S. M. (2015). Prevalence of qnr and aac(6')-Ib-cr Genes in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 40(6), 515-521.
- Elahi, A., Aky, A., Lorestani, R. C., Ghadiri, K., & Baakhshii, S. (2019). Molecular Typing of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Medical Centers in Kermanshah Using Pulse Field Gel Electrophoresis. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, 7(2), Article 2. <https://doi.org/10.5812/pedinfect.84331>
- El-Badawy, M. F., Tawakol, W. M., El-Far, S. W., Maghrabi, I. A., Al-Ghamdi, S. A., Mansy, M. S., Ashour, M. S., & Shohayeb, M. M. (2017). Molecular Identification of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Recovered from Egyptian Patients. *International Journal of Microbiology*, 2017, 8050432. <https://doi.org/10.1155/2017/8050432>
- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., & Vila, J. (2009). Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial biotechnology*, 2(1), 40-61. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x>

- Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4), 661-681.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00043-12>
- Ferreira, R. L., da Silva, B. C. M., Rezende, G. S., Nakamura-Silva, R., Pitondo-Silva, A., Campanini, E. B., Brito, M. C. A., da Silva, E. M. L., Freire, C. C. de M., da Cunha, A. F., & Pranchevicius, M.-C. da S. (2019). High Prevalence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Harboring Several Virulence and β -Lactamase Encoding Genes in a Brazilian Intensive Care Unit. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3198. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03198>
- Flores-Valdez, M., Ares, M. A., Rosales-Reyes, R., Torres, J., Girón, J. A., Weimer, B. C., Mendez-Tenorio, A., & De la Cruz, M. A. (2021). Whole Genome Sequencing of Pediatric *Klebsiella pneumoniae* Strains Reveals Important Insights Into Their Virulence-Associated Traits. *Frontiers in Microbiology*, 12, 711577. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.711577>
- Foudraine, D. E., Strepis, N., Klaassen, C. H. W., Raaphorst, M. N., Verbon, A., Luider, T. M., Goessens, W. H. F., & Dekker, L. J. M. (2021). Rapid and Accurate Detection of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and 16S rRNA Methyltransferases by Targeted Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(7).
<https://doi.org/10.1128/JCM.00464-21>
- Galimand, M., Courvalin, P., & Lambert, T. (2003). Plasmid-Mediated High-Level Resistance to Aminoglycosides in Enterobacteriaceae Due to 16S rRNA Methylation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(8), 2565-2571. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.8.2565-2571.2003>
- Geetha, P. V., Aishwarya, K. V. L., Mariappan, S., & Sekar, U. (2020). Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates of *Klebsiella Pneumoniae*. *Journal of Laboratory Physicians*, 12(2), 121-125.
<https://doi.org/10.1055/s-0040-1716478>

- Giannitsioti, E., Louka, C., Mamali, V., Kousouli, E., Velentza, L., Papadouli, V., Loizos, G., Mavroudis, P., Kranidiotis, G., Rekleiti, N., Stamati, A., Speggos, I., Daniil, I., Kouvatso, P., Sidiropoulou, C., Linardaki, G., Gerakari, S., Chryso, G., Themeli-Digalaki, K., & Zarkotou, O. (2022). Bloodstream Infections in a COVID-19 Non-ICU Department: Microbial Epidemiology, Resistance Profiles and Comparative Analysis of Risk Factors and Patients' Outcome. *Microorganisms*, 10(7), 1314. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071314>
- Goudarzi, M., Azad, M., & Seyedjavadi, S. S. (2015). Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants and OqxAB Efflux Pumps among Extended-Spectrum β -Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Patients with Nosocomial Urinary Tract Infection in Tehran, Iran. *Scientifica*, 2015, 518167. <https://doi.org/10.1155/2015/518167>
- Habboush, Y., & Guzman, N. (2023). Antibiotic Resistance. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/>
- Haldorsen, B. C., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A., & Samuelsen, Ø. (2014). Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. In Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(1), 66-69. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.10.001>
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), 12-31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>
- Jomehzadeh, N., Ahmadi, K., & Bahmanshiri, M. A. (2022). Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in southwest Iran. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(7), e24342. <https://doi.org/10.1002/jcla.24342>
- Kaczmarek, F. M., Dib-Hajj, F., Shang, W., & Gootz, T. D. (2006). High-Level Carbapenem Resistance in a *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolate Is Due to the Combination of blaACT-1 β -Lactamase

Production, Porin OmpK35/36 Insertional Inactivation, and Down-Regulation of the Phosphate Transport Porin PhoE. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(10), 3396-3406. <https://doi.org/10.1128/AAC.00285-06>

Kareem, S. M., Al-kadmy, I. M., Kazaal, S. S., Ali, A. N. M., Aziz, S. N., Makharita, R. R., Algammal, A. M., Al-Rejaie, S., Behl, T., Batiha, G. E.-S., El-Mokhtar, M. A., & Hetta, H. F. (2021). Detection of *gyrA* and *parC* Mutations and Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Drug Resistance*, 14, 555-563. <https://doi.org/10.2147/IDR.S275852>

Lau, M. Y., Teng, F. E., Chua, K. H., Ponnampalavanar, S., Chong, C. W., Jabar, K. A., & Teh, C. S. J. (2021). Molecular Characterization of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Malaysia Hospital. *Pathogens*, 10(3), 279. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030279>

Leila Azimi, Shahnaz Armin, Hossein Samadi Kafil, Nafiseh Abdollahi, Kiarash Ghazvini, Sepide Hasanzadeh, Shahram Shahraki Zahedani, Sedigheh Rafiei Tabatabaei, & Fatemeh Fallah. (2024, febrero 4). *Evaluation of phenotypic and genotypic patterns of aminoglycoside resistance in the Gram-negative bacteria isolates collected from pediatric and general hospitals—PMC*. Molecular and cellular pediatrics. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8816979/>

Li, Y., Kumar, S., Zhang, L., Wu, H., & Wu, H. (2023). Characteristics of antibiotic resistance mechanisms and genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Open Medicine*, 18(1), 20230707. <https://doi.org/10.1515/med-2023-0707>

M100Ed33 | Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd Edition. (s. f.). Clinical & Laboratory Standards Institute. Recuperado 5 de febrero de 2024, de <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>

- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Micheli, G., Sangiorgi, F., Catania, F., Chiuchiarelli, M., Frondizi, F., Taddei, E., & Murri, R. (2023). The Hidden Cost of COVID-19: Focus on Antimicrobial Resistance in Bloodstream Infections. *Microorganisms*, *11*(5), 1299. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051299>
- Morfin-Otero, R., Tinoco-Favila, J. C., Sader, H. S., Salcido-Gutierrez, L., Perez-Gomez, H. R., Gonzalez-Diaz, E., Petersen, L., & Rodriguez-Noriega, E. (2012). Resistance trends in gram-negative bacteria: Surveillance results from two Mexican hospitals, 2005–2010. *BMC Research Notes*, *5*(1), 277. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-277>
- Moya, C., & Maicas, S. (2020). Antimicrobial Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Strains: Mechanisms and Outbreaks. *Proceedings*, *66*(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/proceedings2020066011>
- M. Pham, T. D., M. Ziora, Z., & T. Blaskovich, M. A. (2019). Quinolone antibiotics. *MedChemComm*, *10*(10), 1719-1739. <https://doi.org/10.1039/C9MD00120D>
- Nasiri, G., Peymani, A., Farivar, T. N., & Hosseini, P. (2018). Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* collected from Qazvin and Tehran provinces, Iran. *Infection, Genetics and Evolution*, *64*, 219-224. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.06.030>

- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(3), 252-275.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
- Permatasari, T. W., Kusumo, A. S. W., Yasmon, A., & Ambarwulan, M. (2023). *Aminoglycoside resistance phenotype and genotype characteristics in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: Interaction with an external clinical patient with an intraabdominal infection in Cipto Mangunkusumo National General Hospital (RSCM)*. *46*(11).
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, *11*(4), 589-603.
- Pourajam, S., Kalantari, E., Talebzadeh, H., Mellali, H., Sami, R., Soltaninejad, F., Amra, B., Sajadi, M., Alenaseri, M., Kalantari, F., & Solgi, H. (2022). Secondary Bacterial Infection and Clinical Characteristics in Patients With COVID-19 Admitted to Two Intensive Care Units of an Academic Hospital in Iran During the First Wave of the Pandemic. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 784130. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.784130>
- Pulingam, T., Parumasivam, T., Gazzali, A. M., Sulaiman, A. M., Chee, J. Y., Lakshmanan, M., Chin, C. F., & Sudesh, K. (2022). Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *170*, 106103. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106103>
- Rahim, N. A., 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(9), 2589.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkv135>

- Rocker, A., Lacey, J. A., Belousoff, M. J., Wilksch, J. J., Strugnell, R. A., Davies, M. R., & Lithgow, T. (2020). Global Trends in Proteome Remodeling of the Outer Membrane Modulate Antimicrobial Permeability in *Klebsiella pneumoniae*. *mBio*, *11*(2), 10.1128/mbio.00603-20. <https://doi.org/10.1128/mbio.00603-20>
- Russell, J. B., & Houlihan, A. J. (2003). Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiology Reviews*, *27*(1), 65-74. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00019-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00019-6)
- Russo, T. A., & Marr, C. M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(3), e00001-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-19>
- Rydberg, J., Larsson, C., & Miörner, H. (1994). Resistance to Fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, *26*(3), 317-320. <https://doi.org/10.3109/00365549409011801>
- Samer Swedan, Emad Addin Alabdallah, & Qutaiba Ababneh. (2023, diciembre 6). *Resistance to aminoglycoside and quinolone drugs among Klebsiella pneumoniae clinical isolates from northern Jordan: Heliyon*. [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(23\)10576-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844023105767%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(23)10576-7?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS2405844023105767%3Fshowall%3Dtrue)
- Sánchez-Álvarez, B. P., Rincón-Zuno, J., Mejía-Caballero, L., Hernández-Castellanos, C. A., Diaz-Conde, M., Magaña-Matienzo, I., & Terrazas-Peraza, A. A. (2022). Estado actual de resistencia antimicrobiana en población pediátrica en un hospital de México. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, *60*(4), 371-378.
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*, *2016*, 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>

- Shakti Rath & Rabindra N. Padhy. (2014, julio 2). *Prevalence of two multidrug-resistant Klebsiella species in an Indian teaching hospital and adjoining community—ScienceDirect*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876034114000756?via%3Dihub#sec003>
- 5
- Shin, S. Y., Kwon, K. C., Park, J. W., Song, J. H., Ko, Y. H., Sung, J. Y., Shin, H. W., & Koo, S. H. (2009). Characteristics of aac(6')-Ib-cr gene in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Chungnam area. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 29(6), 541-550. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.6.541>
- Tohamy, S. T., Aboshanab, K. M., El-Mahallawy, H. A., El-Ansary, M. R., & Afifi, S. S. (2018). Prevalence of multidrug-resistant Gram-negative pathogens isolated from febrile neutropenic cancer patients with bloodstream infections in Egypt and new synergistic antibiotic combinations. *Infection and Drug Resistance*, 11, 791-803. <https://doi.org/10.2147/IDR.S163293>
- Wang, N., Luo, J., Deng, F., Huang, Y., & Zhou, H. (2022). Antibiotic Combination Therapy: A Strategy to Overcome Bacterial Resistance to Aminoglycoside Antibiotics. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 839808. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.839808>
- Yang, W., & Hu, F. (2022). Research Updates of Plasmid-Mediated Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methyltransferase. *Antibiotics*, 11(7), 906. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070906>
- Zhang, Y., Wang, Q., Yin, Y., Chen, H., Jin, L., Gu, B., Xie, L., Yang, C., Ma, X., Li, H., Li, W., Zhang, X., Liao, K., Man, S., Wang, S., Wen, H., Li, B., Guo, Z., Tian, J., ... Wang, H. (2018). Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Report from the China CRE Network. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(2), e01882-17.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01882-17>
- Zhong, X., Xu, H., Chen, D., Zhou, H., Hu, X., & Cheng, G. (2014). First Emergence of acrAB and oqxAB Mediated Tigecycline Resistance in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Pre-Dating the

Use of Tigecycline in a Chinese Hospital. *PLoS ONE*, 9(12), e115185.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115185>

Anexos

Anexo 1: antibióticos resistentes en las cepas de *K.pneumoniae* aisladas del Hospital del Niño Poblano y perfil fenotípico de BLEE/ AmpC

Clave cepario	Antibióticos a los que fueron resistentes	BLEE	AmpC	
KpNP1	AMC, FOX, CAZ, FEP, MEM, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, CL, SXT	negativo	negativo	PDR
KpNP2	AMC, CAZ, FEP, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	MDR
KpNP3	AMC, CAZ, FEP, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	MDR
KpNP4	AMC, CRO, CAZ, FEP, IMP, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, CL, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP5	AMC, CAZ, CRO, FEP, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP6	CRO, CAZ, AN, CIP	negativo	negativo	MDR
KpNP7	AMC, FOX, CRO, CAZ, FEP, MEM, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP8	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, MEM, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP9	AMC, TIM, CAZ, CRO, FEP, MEM, IPM, AN, GEN, NN, CIP, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP10	CRO, CAZ, AN, CIP	negativo	negativo	MDR
KpNP11	AMC, TIM, CAZ, CRO, FEP, MEM, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP12	AMC, TIM, CAZ, FEP, MEM, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP13	AMC, CAZ, CRO, FEP, MEM, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP14	AMC, FOX, CAZ, CRO, FEP, MEM, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP15	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, MEM, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP16	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, MEM, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, CL, SXT	positivo	negativo	PDR

KpNP17	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, NOR, LVX, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP18	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, TE, AN, GEN, NN, CIP, NOR, SXT	positivo	negativo	MDR
KpNP19	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, NOR, LVX, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP20	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP21	AMC, TIM, FOX, CRO, CAZ, FEP, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, CL, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP22	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, MEM, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, CL, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP23	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, MEM, IPM, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP24	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, MEM, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, CL, SXT	negativo	negativo	PDR
KpNP25	AMC, TIM, CRO, FEP, IPM, AN, NN, CIP, SXT	positivo	negativo	MDR
KpNP26	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, MEM, IPM, TE, AN, NN, CIP, LVX, NOR, CL, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP27	AMC, TIM, FOX, CRO, CAZ, FEP, MEM, IPM, TE, AN, NN, CIP, LVX, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP28	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, MEM, IPM, AN, GEN, NN, CIP, LVX	positivo	negativo	MDR
KpNP30	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, MEM, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	PDR
KpNP33	AMC, TIM, CRO, CAZ, FEP, IPM, TE, AN, GEN, NN, CIP, LVX, NOR, SXT	positivo	negativo	PDR

AMC: Amoxicilina- ácido clavulánico, **TIM:** Ticarcilina- ácido Clavulánico, **FOX:** cefoxitina, **CRO:** Ceftriaxona, **CAZ:** Ceftazidima, **FEP:** cefepime, **MEM:** memorepenen, **IPM:** imipenem, **TE:**tetraciclina, **AN:** amikacina, **GM:** gentamicina, **NN:** tobramicina, **CIP:** ciprofloxacino, **LVX:** levofloxacino, **NOR:** Norfloxacino, **CL:** cloranfenicol y **SXT:** trimetoprim sulfametoxazol; Cepas que presentaron el fenotipo BLEE y clasificación en cuanto a la resistencia según Magiorakos.

Anexo 2. Cepas de *K. pneumoniae* resistentes a amikacina acorde el método de Concentración mínima inhibitoria y presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos,

Hospital para el Niño Poblano			
Clave cepario	CMI (µg/ml)	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(3)-II</i>
	AMK		
KpNP1	32 µg/ml (R)	+	+
KpNP4	128 µg/ml (R)	+	—
KpNP5	8 µg/ml (I)	+	—
KpNP7	8 µg/ml (I)	+	+
KpNP9	>128 µg/ml (R)	—	+
KpNP11	16 µg/ml (R)	+	+
KpNP13	8 µg/ml (I)	+	+
KpNP14	8 µg/ml (I)	+	+
KpNP19	8 µg/ml (I)	+	+
KpNP20	8 µg/ml (I)	+	+
KpNP22	8 µg/ml (I)	+	+
KpNP24	8 µg/ml (I)	+	+
KpNP25	8 µg/ml (I)	+	+
KpNP27	16 µg/ml (R)	+	+
KpNP28	128 ≥ µg/ml (R)	—	+
KpNP30	8 µg/ml (I)	+	+
KpNP33	8 µg/ml (I)	+	+

Hospital Regional I.S.S.S.T.E, Puebla			
Clave cepario	CMI (µg/ml)	<i>aac(6')</i>	<i>aac(3')-</i>
	AMK		
Kpn1	128 µg/ml (R)	—	+
Kpn2	8 µg/ml (I)	+	+
Kpn3	16 µg/ml (R)	+	+
Kpn5	32 µg/ml (R)	+	+
Kpn6	128 ≥ µg/ml (R)	—	+

Kpn7	16 µg/ml (R)	+	+
Kpn8	8 µg/ml (I)	+	+
Kpn9	128 ≥ µg/ml (R)	—	+
kpn 16	16 µg/ml (R)	+	+
kpn20	8 µg/ml (I)	+	+
kpn22	16 µg/ml (R)	—	+
kpn23	8 µg/ml (I)	—	+

Anexo 2.1. Cepas de *K. oxytoca* y presencia de enzimas modificadoras de aminoglucósidos,

Hospital para el Niño Poblano			
Clave cepario	CMI (µg/ml)	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(3)-II</i>
	AMK		
KpNP29	16 µg/ml (R)	+	+
KpNP31	32 µg/ml (R)	+	+

Hospital Regional I.S.S.S.T.E, Puebla			
Clave cepario	CMI (µg/ml)	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>aac(3)-II</i>
	AMK		
KOxytoca12	8 µg/ml (I)	+	+

Anexo 3. CMI de Quinolonas y Genotipo *qnr* en Cepas de *K. pneumoniae*

Hospital del Niño Poblano				
Cepa	CMI (µg/ml)		<i>qnrB</i>	<i>qnrA</i>
	Norfloxacino	Ciprofloxacino		
KpNP 1	S	1 µg/ml (R)	-	-
KpNP 2	I	2 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 3	I	2 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 4	S	1 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 5	128 µg/ml (R)	64 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 6	S	S	-	-

KpNP 7	I	8 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 8	S	1 µg/ml (R)	-	-
KpNP 9	S	S	-	-
KpNP 10	S	S	-	-
KpNP 11	I	4 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 12	I	4 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 13	S	4 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 14	S	4 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 15	S	2 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 16	S	1 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 17	I	2 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 18	I	2 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 19	I	4 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 20	I	4 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 21	>128 µg/ml (R)	>128 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 22	S	4 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 23	32 µg/ml (R)	32 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 24	I	8 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 25	NR	2 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 26	I	4 µg/ml (R)	-	-
KpNP 27	NR	S	+	NR
KpNP 28	NR	16 µg/ml (R)	-	-
KpNP 30	I	4 µg/ml (R)	+	NR
KpNP 33	I	4 µg/ml (R)	+	NR

Hospital Regional I.S.S.S.T.E, Puebla				
Cepa	CMI (µg/ml)		qnrB	qnrA
	Norfloxacino	Ciprofloxacino		
KpN 1	128 µg/ml (R)	64 µg/ml (R)	+	NR
KpN 2	NR	4 µg/ml (R)	+	NR
KpN 3	NR	4 µg/ml (R)	+	NR
KpN 4	>128 µg/ml (R)	128 µg/ml (R)	+	NR

KpN 5	>128 µg/ml (R)	128 µg/ml (R)	-	-
KpN 6	64 µg/ml (R)	64 µg/ml (R)	+	NR
KpN 7	S	64 µg/ml (R)	+	NR
KpN 8	NR	4 µg/ml (R)	+	NR
KpN 9	128 µg/ml (R)	2 µg/ml (R)	+	NR
KpN 10	NR	64 µg/ml (R)	+	NR
KpN 11	>128 µg/ml (R)	4 µg/ml (R)	+	NR
KpN 13	>128 µg/ml (R)	128 µg/ml (R)	+	NR
KpN 14	>128 µg/ml (R)	128 µg/ml (R)	+	NR
KpN 15	S	4 µg/ml (R)	-	-
KpN 16	NR	4 µg/ml (R)	+	NR
KpN 17	32 µg/ml (R)	32 µg/ml (R)	+	NR
KpN 18	64 µg/ml (R)	64 µg/ml (R)	+	NR
KpN 19	NR	1 µg/ml (R)	+	NR
KpN 20	NR	4 µg/ml (R)	+	NR
KpN 21	>128 µg/ml (R)	128 µg/ml (R)	+	NR
KpN 22	16 µg/ml (R)	>128 µg/ml (R)	+	NR
KpN 23	NR	4 µg/ml (R)	+	NR

Anexo 3.1 CMI de Quinolonas y Genotipo *qnr* en Cepas de *K. oxytoca*

Cepa	Hospital del Niño Poblano			
	CMI (µg/ml)		qnrB	qnrA
	Norfloxacino	Ciprofloxacino		
KpNP29	NR	0.25	NR	-
KpNP31	R (32 µg/ml)	0.125	+	-