



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
I.S.S.S.T.E.
CENTRO MÉDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE
INFECTOLOGÍA PEDIÁTRICA

PERFILES FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS DETERMINANTES DEL
MECANISMO DE RESISTENCIA EN CEPAS NOSOCOMIALES DE *Klebsiella*

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN:
INFECTOLOGÍA

PRESENTA:
DRA. GRACIELA RAMÍREZ TEPOPOTLA

ASESOR:
DR. JOSÉ FERNANDO HUERTA ROMANO



MÉXICO, D.F. 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PERFILES FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS DETERMINANTES DEL
MECANISMO DE RESISTENCIA EN CEPAS NOSOCOMIALES DE *Klebsiella*

Dr. Mauricio Di Silvio López
Subdirector de enseñanza e investigación
CMN "20 de Noviembre" I.S.S.S.T.E.

Dr. José Fernando Huerta Romano
Profesor titular de la especialidad en infectología
CMN "20 de Noviembre" I.S.S.S.T.E.

Dr. José Fernando Huerta Romano
Asesor de Tesis
CMN "20 de Noviembre" I.S.S.S.T.E.

Dra. Graciela Ramírez Tepopotla
Médico residente de la especialidad en infectología pediátrica.
CMN "20 de Noviembre" I.S.S.S.T.E.

ÍNDICE

HOJA INICIAL _____	1
HOJA DE FIRMAS _____	2
RESÚMEN _____	4
INTRODUCCIÓN _____	5
MATERIAL Y MÉTODOS _____	10
RESULTADOS _____	13
DISCUSIÓN _____	15
BIBLIOGRAFÍA _____	17
GRÁFICAS Y CUADROS _____	18

RESÚMEN

Introducción: Las infecciones nosocomiales por especies de *Klebsiella* han aumentado en parte debido a el uso indiscriminado de antibióticos lo cual ha sido responsable de la emergencia de cepas drogorresistentes, es imperativo realizar una correlación entre los patrones de susceptibilidad mediante sistemas convencionales, con estudios moleculares (ERIC-PCR), capaces de determinar la relación clonal entre varios aislados de una misma especie, esto es útil sobre todo cuando se producen brotes epidémicos.

Material y métodos: Es un estudio prospectivo, transversal, descriptivo, observacional, abierto, en el período de tiempo comprendido de Julio 2006 a Julio 2007, que incluye los resultados de aislamientos de especies y subespecies de *Klebsiella* en sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, secreción bronquial, punta de catéter, con determinación de antibiograma por sistema automatizado Vitek y pruebas de difusión en disco, se realizó determinación de β -lactamasas y finalmente sometido a estudio de genotipificación mediante ERIC-PCR. Los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva.

Resultados: Se analizaron 24 aislamientos, presentándose **142 resistencias (49.30%)** y **146 sensibles (50.7%)** mediante pruebas de difusión en disco, mediante sistema automatizado **113 determinaciones resistentes (R) (27.69%), 285 sensibles (S)** con un promedio de **69.85%** y **10 con sensibilidad intermedia (I)**, con un promedio de **2.45%**. Los resultados de ERIC-PCR muestran la relación clonal por similitud en el patrón de bandas obtenidos para las diferentes especies y subespecies.

Discusión: Se establece la utilidad y la necesidad de implementar los métodos de Biología Molecular, como parte de los procedimientos útiles y de bajo costo para un mejor control de la epidemiología de las infecciones nosocomiales.

INTRODUCCIÓN

La gran mayoría de las infecciones por *Klebsiella* están asociadas con la hospitalización; como patógenos oportunistas, las especies del género *Klebsiella* infectan principalmente a individuos inmunocomprometidos hospitalizados y con severas enfermedades subyacentes, como diabetes mellitus, larga estancia hospitalaria, prematurez, nutrición parenteral, estancia en unidad de cuidados intensivos, obstrucción pulmonar crónica, etc. Las infecciones nosocomiales por *Klebsiella* son causadas principalmente por la especie *pneumoniae*, la más importante del género desde el punto de vista médico y están asociadas a una alta morbilidad y mortalidad ^{1,2}.

Se estima que *Klebsiella* es responsable del 8% de infecciones nosocomiales bacterianas en Estados Unidos y Europa, lo que la sitúa entre los ocho patógenos infecciosos más importantes en hospitales; en México, se desconocen las cifras, sin embargo durante las dos últimas décadas las bacterias Gram negativas como *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp* y *Pseudomonas spp* se encuentran entre las causas más frecuentes de infección nosocomial, con alta mortalidad asociada ^{3,4,5}. Datos no publicados de un trabajo realizado en la Coordinación de Pediatría del CMN "20 de Noviembre" en el periodo de enero de 2005 a julio de 2006, muestran que en cultivos positivos obtenidos de áreas corporales normalmente estériles, *Klebsiella pneumoniae* se obtuvo en 6.3 % de hemocultivos y 12.4 % de urocultivos (llegando a ocupar el 2º. Y 4º. lugar entre los microorganismos aislados respectivamente).

Klebsiella pneumoniae causa principalmente, infecciones del tracto urinario, sepsis, neumonía, infección relacionada a catéter, infección relacionada a procedimientos invasivos, endocarditis, infección de tejidos blandos. El porcentaje de individuos portadores de *Klebsiella* aumenta radicalmente en el ambiente hospitalario y la colonización en el paciente se asocia significativamente con la utilización de antibióticos ^{1,2}.

Las terapias antimicrobianas, han sido a menudo responsables de la emergencia de cepas de *Klebsiella* resistentes a múltiples antibióticos en hospitales, lo cual ha generado un renovado interés en el estudio de *Klebsiella* como agente infeccioso ³.

Se han reportado brotes por *K. pneumoniae* multirresistente en diferentes regiones del país relacionadas con la producción de β -lactamasas de espectro extendido. *K. pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* son especies patógenas asociadas a menudo a infecciones nosocomiales cuyas alternativas terapéuticas son cada vez menores por ser importantes fuentes de resistencia antibiótica transferible ^{6,7,8}.

En Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales se han reportado muchos brotes de *Klebsiella*, frecuentemente asociados con colonización extensa en recién nacidos, infecciones sistémicas y muerte. Tanto la dispersión de *K. pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido fuera de las unidades de cuidados intensivos como la diseminación de resistencia plasmídica entre enterobacterias, constituyen un problema significativo dado que afectan la eficacia de los tratamientos antibióticos en los pacientes y el control epidemiológico en infecciones hospitalarias ⁹. La presencia de estas enzimas es la causa más importante de resistencia a los β -lactámicos, los cuales actúan hidrolizando el anillo oxiimino-aminotiazolil, inactivando así las penicilinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a. Generación y monobactams.

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas derivadas de las familias TEM y SHV, codificadas en plásmidos, que han substituido de 1 a 3 aminoácidos cercanos al sitio activo confiriendo resistencia a aztreonam, cefotaxima y ceftazidima. Son enzimas que poseen actividad hidrolítica sobre los β -lactámicos, estas enzimas confieren grados variables de actividad contra cefalosporinas de tercera generación; muchas de las β -lactamasas de *K. pneumoniae* son derivadas de β -lactamasas tipo SHV-1, TEM-1 y TEM-2, por una ó más sustituciones de aminoácidos que confieren resistencia a las cefalosporinas y aztreonam ^{1,2,4,5}.

Las BLEE se encuentran codificadas principalmente en plásmidos, lo que les confiere una capacidad de diseminación mayor en distintas cepas y en periodos de tiempo corto; en algunos casos estos plásmidos codifican para otros genes de resistencia a antimicrobianos. Por lo tanto, es común que organismos que expresen una BLEE, expresen co-resistencia con los aminoglucósidos, trimetoprim-sulfametoxazol y fluoroquinolonas ¹⁰. Existen numerosos estudios sobre la epidemiología y factores de riesgo de las infecciones debidas a microorganismos productores de BLEE. Con respecto a la aparición de clonas productoras de BLEE en el medio hospitalario, se ha descrito que ocurre por 3 mecanismos:

- 1) Selección de clonas resistentes facilitada por el uso intenso de cefalosporinas de 3^a ó 4^a generación y ciprofloxacino.
- 2) Uso previo de antibacterianos (aminoglucósidos, cloramfenicol, tetraciclinas y trimetoprim/sulfametoxazol), que permita la co-transferencia conjuntamente con la resistencia a beta lactámicos.
- 3) fallas en las medidas de barrera que facilitan la transmisión horizontal de los factores de resistencia.

La mayor parte de los brotes descritos debidos a *K. pneumoniae* productores de BLEE son policlonales ^{11,12}.

La importancia del diagnóstico microbiológico está encaminada a conocer la epidemiología de las enfermedades infecciosas, los estudios de sensibilidad *in vitro* a los antibacterianos están completamente estandarizados y en muchos casos automatizados; en esencia, para la determinación de la sensibilidad *in vitro* de las bacterias a los antimicrobianos, se enfrenta un inóculo de la bacteria a diferentes concentraciones de antibiótico. Algunas organizaciones elaboran periódicamente guías metodológicas estandarizadas para la realización de antibiogramas, de las cuales la más utilizada es la NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*).

En la técnica de difusión en disco (Kirby-Bauer), a partir de un disco de papel con una carga concreta para cada antibiótico, este se difunde al medio de agar; es una técnica cualitativa que permite clasificar la bacteria estudiada y para cada antibiótico, de acuerdo con las normas de referencia, en las siguientes categorías: sensibles (S), intermedias (I), moderadamente sensibles (MS), resistentes (R).

Los sistemas automatizados utilizan técnicas de microdilución asociándose a menudo a la automatización de las pruebas de identificación, existen actualmente diferentes equipos comerciales que utilizan placas de microdilución que se acompañan de programas informáticos para la identificación del microorganismo. (Vitek®) ¹⁶.

En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares de tipificación, basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que han supuesto un importante avance en el estudio de las enfermedades infecciosas, la elección de la técnica depende de factores de tipo técnico y económico. Las técnicas de tipificación basadas en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR poseen un elevado poder de discriminación, son menos laboriosas, más rápidas y más flexibles que la electroforesis en gel por campos pulsados (PFGE) y permiten trabajar con un número mayor de muestras; son útiles para diferenciar grupos de cepas no relacionadas clonalmente, algunas de estas técnicas tienen que ser validadas en el laboratorio (estandarización de protocolos, equipos, reactivos), debido a que presentan una baja reproducibilidad; otras pueden requerir un software adecuado para analizar patrones de bandas de ADN, que son complejos y difíciles de interpretar visualmente.

Entre las diversas técnicas de PCR, se encuentran las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP), y las secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC), que son las que más se han utilizado en estudios epidemiológicos de brotes infecciosos.

La amplificación de secuencias ERIC mediante PCR (ERIC-PCR), es una técnica de tipificación utilizada para estudiar la relación clonal en diversas bacterias Gram negativas, los patrones de DNA que se obtienen suelen ser menos complejos que los generados por REP-PCR.

La distribución de ERIC en diversos genomas es examinada por medio de PCR, las secuencias ERIC están presentes en muy diversas especies de eubacterias y pueden ser utilizadas como iniciadores (primers ERIC, ERIC1R y ERIC2) en la PCR, para producir las impresiones de diferentes genomas bacterianos.

CONSENSO ERIC.

5' - GTGAATCCCCAGGAGCTTACATAAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG - 3'

ERIC1R

3' - CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA - 5'

ERIC2

5' - AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG - 3'

Los resultados de investigaciones demuestran que la PCR solo con ERIC1R ofrece productos de amplificación limitados, dos posibles razones para esta observación, son que cualquiera de las dos grandes secuencias existentes en el lado de la secuencia complementaria repetida invertida de ERIC2 ó su homólogo no relaciona secuencias complementarias para ERIC2 existente por fuera de los elementos de ERIC en el genoma, por lo que se obtienen mejores resultados, empleando el complejo primer (ERIC, ERIC1R, ERIC2).

La PCR emplea iniciadores que conocen distancias de secuencias ERIC y fueron diseñados para verificar el tamaño de los productos de amplificación. La especificidad de ERIC-PCR, fue demostrada por amplificación de PCR de un segmento de DNA, entre una secuencia ERIC editada ^{13,14,15}. La amplificación por PCR de diferentes especies de enterobacterias con los primers ERIC1R y ERIC2 revela patrones de bandas específicos, lo que nos ayuda a identificar la relación clonal de especies de Klebsiella aisladas en pacientes con infección nosocomial.

MATERIAL Y MÉTODOS.

CEPAS BACTERIANAS.

Se aislaron un total de 45 cepas de especies de *Klebsiella* de pacientes con infección nosocomial confirmada, durante el período comprendido de Julio 2006 a Julio de 2007, estas cepas fueron cultivadas en medios agar sangre, agar chocolate y agar Mc Conckey, fueron excluidas 21 cepas por haber perdido su viabilidad durante los procesos de conservación y transporte, sometiendo al estudio un total de 24 cepas.

Para determinación de fenotipo, se realizaron pruebas macroscópicas y microscópicas para identificación de especies y subespecies, incluyendo morfología colonial, tinción de Gram y pruebas bioquímicas como: TSI, producción de gas, producción de ácido, UA (ureasa de Christensen), MIO (movilidad, indol, ornitina), FEN (fenilalanina), CIT (citrato), U (urea), RM (rojo de metilo), M (malonato), VP (Voges-Proskawer), como se puede ver en el **cuadro 1**.

DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE β -LACTAMASAS.

Todas las cepas de *Klebsiella* fueron sometidas a la prueba de Cefinase[®], la cual es un método cromogénico que emplea discos de nitrocefina (Cefinase-Biomerieux), humedecidos con una gota de agua destilada estéril; sobre la superficie del disco se realizó una extensión de parte de una colonia de cada cepa en estudio, la lectura se efectuó a los 3 minutos y se determinó por medio de cambio de color, se consideraron β -lactamasas positivas a colonias que mostraron cambios de color en el disco de amarillo a rojo, como se muestra en el **cuadro 2**.

PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Pruebas de Difusión en Disco (Kirby-Bauer).

Previa inoculación de las cepas en estudio en medio de cultivo Müller-Hinton y difundidos en medios de agar, a partir de un disco de papel con una carga concreta para cada antibiótico, (Amikacina AK, ampicilina AM, carbenicilina CB, ceftazidima CF, cefotaxima CTX, ceftriaxona CRO, cloramfenicol CL, gentamicina GE, netilmicina NET, norfloxacino NF, ofloxacino PEF y timetroprim sulfametoxazol SXT), este se difundió al medio de agar y posteriormente se midieron los halos de inhibición clasificándose como sensible y resistente; los resultados pueden apreciarse en el **cuadro 3**

Sistema Automatizado Vitek®.

Se estableció el patrón de susceptibilidades mediante el sistema automatizado Vitek® por microdilución, que incluyó la tarjeta con los siguientes antibióticos: amikacina, amoxicilina/ácido clavulánico, cefazolina, cefepime, ceftazidima, ceftriaxona, acetilcefuroxima, cefuroxima sódica, ciprofloxacina, gentamicina, meropenem, nitrofurantoína, norfloxacino, ofloxacino, piperacilina, ticarcilina y trimetoprim /sulfametoxazol), estableciéndose dicho patrón de acuerdo a las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) para cada uno de los antibióticos como sensible, resistente e intermedio. Sin embargo no fue posible obtenerlo en todas las cepas debido a pérdida de la viabilidad ó por no contar con el número mínimo requerido de unidades formadoras de colonias para realizar dicha técnica, en total se realizaron 16 antibiogramas mediante sistema automatizado, cuyos resultados expresados en el **cuadro 4**, son discutidos.

EXTRACCIÓN DE DNA.

Una colonia de cada cepa aislada de *Klebsiella* se incubó 18 h en 1.5 ml de caldo BHI (infusión cerebro-corazón), se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos, se realizó un lavado con 500 µl de solución salina estéril y nuevamente se centrifugó por 5 minutos a 13,000 rpm, se sometió a baño María a 95°C por 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 5

minutos; se extrajeron 2 μ l de sobrenadante para obtener el DNA y posteriormente se colocaron en tubos Ependorff para PCR de 0.5 ml los primers, DNA, agua bidestilada, Biomix, para obtener mediante el termociclador modelo Techgene® la Reacción en Cadena de Polimerasa por un total de 30 ciclos, los cuales fueron secuenciados y amplificados mediante el kit Biomix (biotaq, dNTPs, MgCl₂, Buffer). Los requerimientos y la secuencia para la realización de ERIC-PCR incluyeron:

DNA 3 μ l

Primer (ERIC, ERIC1 Y ERIC2) 5 μ l

Agua bidestilada 5 μ l

BIOMIX (biotaq, dNTPs, MgCl₂, Buffer) 12.5 μ l

Primera desnaturalización 94° C 3 minutos

Segunda desnaturalización 94° C 1 minuto

Alineación 50°C 1 minuto

Extensión 72°C 3 minutos

Extensión final 72° C 5 minutos

Terminado este proceso, se colocó en cámara de electroforesis (Electrophoresis Power Supply Computer Controlled Bio-Rad modelo 3000 Xi) a 80 V durante 120 minutos, en geles de agarosa al 1.2% con los primers ERIC, ERIC1 Y ERIC2 para la amplificación de material genético.

Los geles obtenidos durante esta técnica fueron sumergidos en bromuro de etidio y posteriormente introducidos a una cámara de inmunofluorescencia para una correcta visualización y fotografía del patrón de bandas (**Figura 5**).

RESULTADOS

Se procesaron 24 cepas del género *Klebsiella* de pacientes con diagnóstico de infección nosocomial confirmada de los diferentes servicios del hospital, los sitios de aislamiento en orden de frecuencia fueron **hemocultivo periférico 7 (28%), secreción bronquial 5 (21%), punta de catéter 4 (17%), orina 4 (17%), hemocultivo central 3 (13%), líquido cefalorraquídeo 1 (4%) (figura 1).**

Los diagnósticos infectológicos en orden de frecuencia fueron **sepsis 12 (51%), infección de vías urinarias 3 (13%), fiebre y neutropenia 2 (8%), infección relacionada a catéter 2 (8%), neumonía nosocomial asociada a ventilador 2 (8%), osteomielitis 1 (4%), mediastinitis 1 (4%), neuroinfección 1 (4%) (figura 2).**

Las cepas aisladas fueron sometidas a pruebas bioquímicas para la identificación de especie y subespecie encontrando un total de **17 subespecies *pneumoniae* (71%) y 7 subespecies de *rhinoscleromatis* (29%),** posteriormente se determinó la producción de β -lactamasas mediante la prueba de Cefinase siendo **positivas las 24 cepas en estudio (100%).**

Se realizó la prueba de susceptibilidad en disco realizándose un total de **288 pruebas** utilizando sensidiscos con los siguientes antibióticos: AK (amikacina), AM (ampicilina), CB (carbenicilina), CF (ceftazidima), CTX (cefotaxima), CRO (ceftriaxona), CL (cloramfenicol), GE (gentamicina), NET (netilmicina), NF (norfloxacino), PEF (ofloxacino), SXT (trimetoprim/sulfametoxazol), observándose **142 resistencias (49.30%) y 146 sensibles (50.7%) (figura 3).**

Se realizaron un total de **408 pruebas** de susceptibilidad, considerando los antibióticos incluidos en el sistema automatizado Vitek, dando como resultado un total de **113 determinaciones resistentes (R) (27.69%), 285 sensibles (S) (69.85%) y 10 con sensibilidad intermedia (I),** con un promedio de **2.45% (figura 4).**

El análisis molecular de los aislamientos se determinó mediante ERIC-PCR (**figura 5**) utilizando marcadores de peso molecular (Biomix), logrando amplificar y secuenciar todas las cepas en estudio; se pudo apreciar la coincidencia en el patrón de bandas para *Klebsiella pneumoniae subespecie rhinoscleromatis* en los rangos de peso molecular comprendidos entre 603 a 872 kd para las cepas 7,12,13,14 y 18, así como la relación clonal existente entre los marcadores de peso molecular 1353 a 194 kd para las cepas 19 y 21.

Para *Klebsiella pneumoniae subespecie pneumoniae* se observó relación en el patrón de bandas comprendido entre los marcadores de peso molecular 1353 a 603 kd para las cepas 1, 2, 3 y 4, con lo que respecta a las cepas 5, 6, 8, 9 y 10 se puede apreciar la coincidencia de bandas comprendida entre los marcadores de peso molecular 310 a 603 kd. Para la cepa 11 el patrón de bandas se encuentra comprendido entre 1353 a 310 kd de peso molecular; con lo que respecta a la cepa 15 se encuentra comprendido entre 1078 a 310 kd de peso molecular observándose mismo patrón de bandas con la cepa 22, existiendo relación clonal entre las cepas 16, 17, 20, 23 y 24 con coincidencia de bandas entre los marcadores de peso molecular 872 a 310 kd.

DISCUSIÓN

La necesidad de contar con métodos confiables para el estudio de las infecciones nosocomiales en nuestro medio, obliga a conocer aquellos métodos que corroboran los que por métodos convencionales se obtienen en los distintos niveles de atención médica.

Existen actualmente muchas referencias con respecto a la posibilidad de predecir el comportamiento de las cepas nosocomiales de microorganismos, en este caso *Klebsiella*, ante el manejo con antimicrobianos de diferentes características, mediante métodos microbiológicos convencionales, empleando para ello la Lectura Interpretativa del antibiograma, así como los Sistemas Expertos. Estos últimos fundamentados en los estudios de Biología Molecular que han corroborado o contrastado las interpretaciones fenotípicas dependientes de la capacidad del profesional.

Este trabajo muestra la importancia de contar tanto con las determinaciones fenotípicas, así como las genotípicas, que permiten identificar, no solo la especie, sino además la subespecie y la posibilidad por el comportamiento en el patrón de bandas obtenido por PCR de demostrar un posible origen común (Clonalidad) entre las cepas aisladas. Lo anterior se demuestra por el comportamiento en el patrón de bandas obtenido mediante la técnica ERIC-PCR.

Llama la atención que existe una discrepancia entre los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos obtenidos por el Sistema automatizado, con los obtenidos por la prueba de difusión en disco; la explicación puede ser, por una parte, debido a que no se contaba con todos los antibióticos incluidos en la tarjeta del Sistema Vitek para la prueba de difusión, y por la otra, a que no se pudieron procesar todos los antibiogramas por Vitek debido a la poca cantidad de UFC obtenidas en algunos cultivos, que bajo los criterios que se manejan en el laboratorio, por rutina no se realizan. Ahora podemos establecer que son dos las subespecies de *Klebsiella*, las más frecuentemente aisladas para este periodo de estudio: *Klebsiella pneumoniae sub pneumoniae* y *K. pneumoniae sub rhinoscleromatis*. En esta última, llama la

atención una cepa resistente a todos los antibióticos utilizados en la prueba de difusión, que desafortunadamente no puede ser comparada con el sistema automatizado, ya que no se realizó el antibiograma. Desafortunadamente en nuestro medio solo contamos con los sistemas convencionales (cultivo, pruebas bioquímicas y antibiograma por Sistema automatizado) y no es factible aun contar con métodos de Biología Molecular que en forma rutinaria puedan realizarse para un mejor control epidemiológico, por lo que se propone implementar más y mejores protocolos que demuestren los beneficios que esta parte de la Epidemiología Molecular ofrecen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrade V, Silva J. Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la β -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. *Salud Pública Mex* 2004;46:524-528.
2. Casellas J.M. Nannini E. Estudio de un brote debido a aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en un centro asistencial de Rosario- Argentina. *Rev Panam Infectol* 2005;7(4):21-27.
3. Martínez P. Mercado M. Determinación de β -lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. *Coloma Med* 2003;34:130-139.
4. Alpuche AC, Daza TC. Infecciones nosocomiales por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de espectro extendido: asociación de dos peligrosos enemigos. *Enf Infec y Micro* 2002; 22(4):192-199.
5. Calderón R. Sacsquispe C. Caracterización molecular de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido tipo SHV-5 en una unidad de cuidados intensivos neonatal de Lima. *Rev peru med exp salud pública* 2003;20(3):121-127.
6. Rodríguez C. Juárez J. Resistencia a antibióticos de bacilos Gram negativos aislados en unidades de cuidados intensivos. Análisis comparativo de dos períodos (1998-2001). *Medicina (Buenos Aires)* 2003;63:21-27.
7. Podschun R. Ullmann U. *Klebsiella spp.* As Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(4):589-603.
8. Tsay R-W, Siu LK. Characteristics of Bacteremia Between Community-Acquired and Nosocomial *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Arch Intern Med* 2002;162:1021-1027.
9. Sánchez J, Feris-Iglesias J. Aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* productora de Beta-Lactamasa de Espectro Extendido (BLEE) en recién nacidos en el Hospital Infantil Dr. Robert Reid Cabral de Santo Domingo, República Dominicana. *Rev Panam Infectol* 2005;7(4):15-20.
10. Granier SA, Plaisance L. Recognition of two genetic groups in the *Klebsiella spp.* Taxon on the basis of chromosomal β -lactamase and housekeeping gene sequences as well as ERIC-1R PCR typing. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;53: 661-668.
11. Thouraya BH, Foulon T. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *J Med Microbiol* 2003; 52:427-433.
12. Martins JS, Pessoa SL. Endemic Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* at an Intensive Care Unit: Risk Factors for Colonization and Infection. *Microbial Drug Resistance* 2006;12(1): 50-58.
13. Fernández CF. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2004;22(6):355-360.
14. Méndez AS, Pérez RE. La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enf Infecc Microbiol Clin* 2004;22(3):183-192.
15. Versalovic J. Koeuth T. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 1991;19(24):6823-6831.
16. Ausina Ruíz. Moreno Guillén. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Ed. Panamericana, España 2005.p.p. 1596

Cuadros y Figuras

Cuadro 1
Pruebas bioquímicas para la identificación de especies y subespecies de
***klebsiella*.**

CEPA	TSI	GAS	AC	LIA	M	I	O	FEN	CIT	U	RM	Mal	VP	NOMBRE
C. ATCC	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
1	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
2	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
3	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
4	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
5	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
6	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
8	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
9	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
10	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
11	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
15	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
16	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
17	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
20	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
22	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
23	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
24	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	<i>K.pneumoniae subespecie pneumoniae</i>
7	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>K.pneumoniae subespecie rhinoscleromatis</i>
12	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>K.pneumoniae subespecie rhinoscleromatis</i>
13	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>K.pneumoniae subespecie rhinoscleromatis</i>
14	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>K.pneumoniae subespecie rhinoscleromatis</i>
18	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>K.pneumoniae subespecie rhinoscleromatis</i>
19	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>K.pneumoniae subespecie rhinoscleromatis</i>
21	A/A	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	<i>K.pneumoniae subespecie rhinoscleromatis</i>

Cuadro 2
PRUEBA DE CEFINASE

CEPA	R	CEPA	R
1	+	13	+
2	+	14	+
3	+	15	+
4	+	16	+
5	+	17	+
6	+	18	+
7	+	19	+
8	+	20	+
9	+	21	+
10	+	22	+
11	+	23	+
12	+	24	+

Se puede apreciar que todas las cepas son productoras de betalactamasas

Cuadro 3

Resultados de antibiograma por prueba de difusión en disco (Kirby Bauer)

CEPA	AK	AM	CB	CF	CTX	CRO	CL	GE	NET	NF	PEF	SXT	NO. RESISTENCIAS
ATCC	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	9
1	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
2	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
3	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	8
4	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	6
5	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	7
6	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	8
8	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	10
9	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	2
10	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	6
11	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	7
15	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	4
16	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	3
17	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	11
20	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	3
22	S	R	S	R	S	R	R	S	S	R	S	R	6
23	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	4
24	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	7
7	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	3
12	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	9
13	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	10
14	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	4
18	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	3
19	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	5
21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	12

Cuadro 4

Patrones de sensibilidad, resistencia y resistencia intermedia a los antibióticos incluidos en el sistema automatizado de identificación vitek®.

CEPA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17
1	S	S	R	S	R	R	I	R	S	S	R	S	R	R	R	S	R
2	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	I	S	R	S	S	S	R
3	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	I	I	R	R
4	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	R
5	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	I	R
6	S	R	R	S	S	S	I	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S
8	S	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	I	S
9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	S	R	R	R	R	S	S	R	I	S	S	R	R	R	R	R	R
11	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R
16	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S
7	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S
12	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	I	I	S	R
13	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
14	S	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R	S	S	I	R
21	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	R	R

A1 AMIKACIN
A2 AMOXICILINA/AC
A3 CEFAZOLIN
A4 CEFEPIME
A5 CEFTAZIDIMA
A6 CEFTRIAXONA
A7 CEFUROXIMA/AX

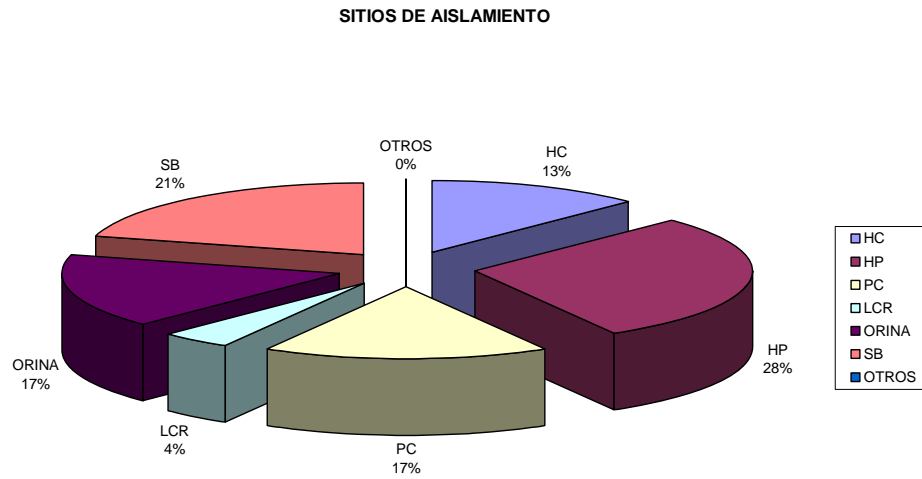
A8 CEFUROXIMA/S
A9 CIPROFLOXACIN
A10 GENTAMICIN
A11 MEROPENEM
A12 NITROFURANTOIN
A13 NORFLOXACIN
A14 OFLOXACIN

A15 PIPERACILIN
A16 TICARCILIN/CA
A17 TMP/SMX

Antibiograma de las 24 cepas aisladas

FIGURA 1

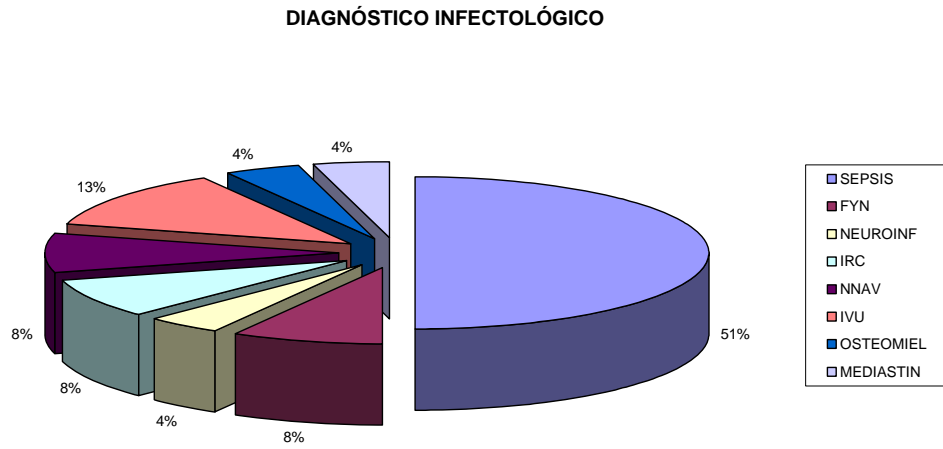
SITIOS DE AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae*



HC HEMOCULTIVO CENTRAL
HP HEMOCULTIVO PERIFÉRICO
PC PUNTA DE CATÉTER
LCR LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO
ORINA
SECRECIÓN BRONQUIAL

FIGURA 2

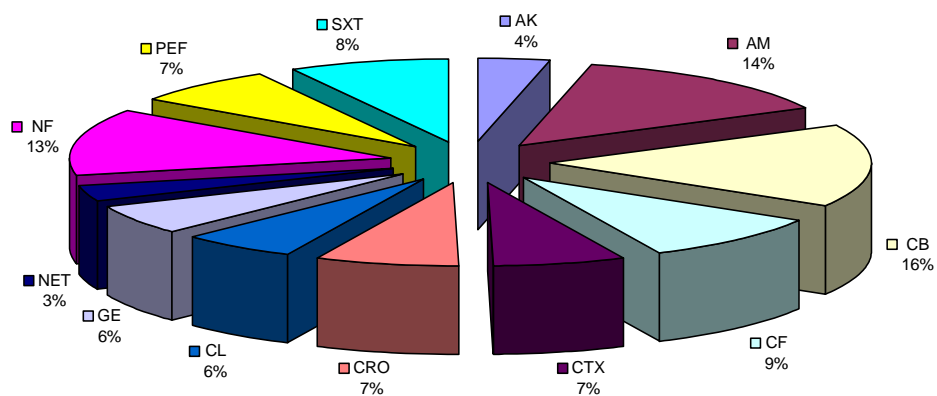
DIAGNÓSTICO INFECTOLÓGICO DE PACIENTES CON AISLAMIENTO DE *Klebsiella pneumoniae*.



SEPSIS, INFECCIÓN DE VÍAS URINARIAS, FIEBRE Y NEUTROPENIA, INFECCIÓN RELACIONADA A CATÉTER, NEUMONÍA NOSOCOMIAL ASOCIADA A VENTILADOR, OSTEOMIELITIS, MEDIASTINITIS Y NEUROINFECCIÓN.

FIGURA 3

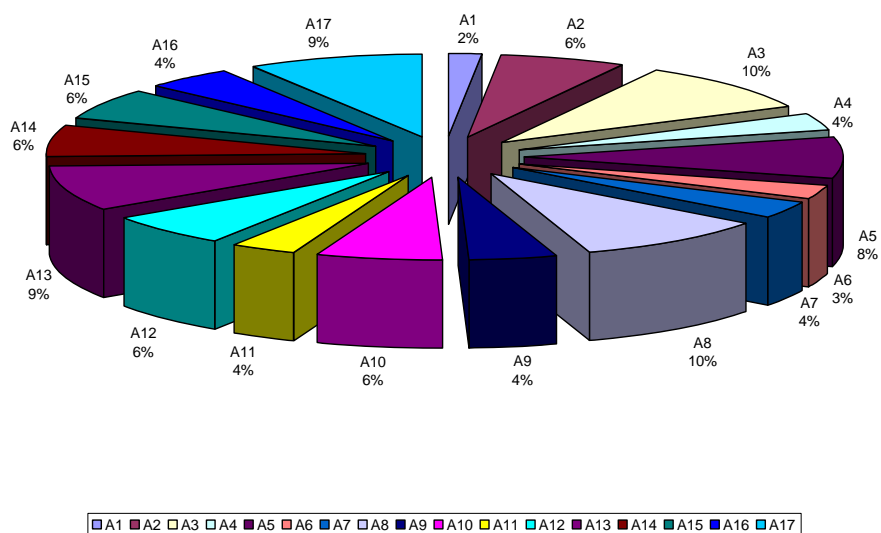
PORCENTAJE DE RESISTENCIA KIRBY-BAUER



AK= AMIKACINA, AM=AMPICILINA, CB=CARBENICILINA,CF= CEFTAZIDIMA, CTX=CEFOTAXIMA, CRO= CEFTRIAXONA, CL= CLORAMFENICOL, GE= GENTAMICINA, NET= NETILMICINA, NF= NORFLOXACINO, PEF= OFLOXACINO, SXT= TIMETROPRIM SULFAMETOXAZOL

FIGURA 4

PORCENTAJE DE RESISTENCIA MEDIANTE SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK.



A1 AMIKACIN
A2 AMOXICILINA/AC
A3 CEFAZOLIN
A4 CEFEPIME
A5 CEFTAZIDIMA
A6 CEFTRIAXONA
A7 CEFUROXIMA/AX

A8 CEFUROXIMA/S
A9 CIPROFLOXACIN
A10 GENTAMICIN
A11 MEROPENEM
A12 NITROFURANTOIN
A13 NORFLOXACIN
A14 OFLOXACIN

A15 PIPERACILIN
A16 TICARCILIN/CA
A17 TMP/SMX

FIGURA 5

GEL DE AGAROSA REPRESENTATIVO DE LOS PATRONES DE BANDAS GENERADOS POR ELECTROFORESIS CON LOS PRIMERS ERIC, ERIC1 Y ERIC2 DE ESPECIES Y SUBESPECIES DE *Klebsiella pneumoniae*.

Klebsiella pneumoniae
sub rhinoscleromatis

Klebsiella pneumoniae subespecie *pneumoniae*

