

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRÍA CMN SIGLO XXI
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE AISLADOS
DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* DE HEMOCULTIVOS DE
PACIENTES PEDIÁTRICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD DE
PEDIATRÍA MÉDICA

PRESENTA

Lucina Magdalena López González

Tutores

Dr. Miguel Ángel de la Cruz Villegas

Dra. Guadalupe Miranda Novales

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dr. Miguel Ángel de la Cruz Villegas
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias,
Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del
Seguro Social

Dra. Guadalupe Miranda Novales
Profesor Titular de Especialidad Pediatría Médica

Investigador responsable:

Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas

Doctor en Ciencias Bioquímicas, Investigador asociado B, Unidad de Investigación
Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro
Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Tel. 56276900
Ext 22408. Correo-e: miguel_angel_81@live.com

INDICE

1. RESUMEN.....	4
2. ANTECEDENTES	5
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
4. HIPOTESIS	15
5. OBJETIVOS	16
6. CRITERIOS DE SELECCIÓN	17
7. MATERIAL Y MÉTODOS	17
8. VARIABLES	18
9. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO.....	21
10. RESULTADOS.....	26
11. DISCUSIÓN.....	31
12. CONCLUSIÓN.....	34
13. REFERENCIAS.....	35
ANEXO 1.....	38

Resumen

Título. Caracterización fenotípica y molecular de aislados clínicos de cepas de *Klebsiella pneumoniae* aislados de hemocultivos de pacientes pediátricos.

Objetivos. 1) Determinar los factores de virulencia de *K. pneumoniae* en aislados de hemocultivos de pacientes pediátricos de nuestro hospital. 2) Determinar el perfil de resistencia de las cepas aisladas de *K. pneumoniae* de pacientes pediátricos de nuestro hospital y determinar el número de cepas multirresistentes. 3) Determinar qué porcentaje de cepas son productoras de BLEE.

Antecedentes. Las infecciones nosocomiales son de los principales problemas de salud pública que afectan a los pacientes en todos los hospitales a nivel mundial. *Klebsiella pneumoniae* es un patógeno de adquisición hospitalaria con el potencial de ocasionar morbilidad y mortalidad severa en pacientes pediátricos. Los principales factores implicados en la virulencia de *K. pneumoniae* son: los pilis, la cápsula de polisacárido, los sideróforos y el lipopolisacárido (LPS), los cuales le permiten a la bacteria entrar y multiplicarse en el hospedero. El pili tipo 3 de *K. pneumoniae* juega un papel importante en la patogenicidad de acuerdo a diversos estudios que han demostrado su relevancia en la adherencia a células eucariotas y durante la formación de biopelículas. La cápsula de *K. pneumoniae* le proporciona una alta resistencia a la desecación así como protección frente a la fagocitosis mediada por los polimorfonucleares y macrófagos. No hay estudios específicos acerca de los factores de virulencia de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los pacientes pediátricos con bacteriemias en nuestro hospital, por lo que el estudio de sus características patogénicas nos ayudarán a comprender su comportamiento en las diferentes patologías.

Material y métodos. Se trató de un estudio transversal descriptivo en el que se cuantificó la formación de biopelículas y mucoviscosidad de los aislados clínicos de *K. pneumoniae*. Se determinó la adherencia de las cepas de *K. pneumoniae* a células epiteliales A549 y se evaluó la resistencia a la fagocitosis de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* usando macrófagos THP-1.

Resultados. De un total de 24 cepas *Klebsiella pneumoniae* aisladas de hemocultivos de pacientes pediátricos, el 100% de los aislamientos tuvo formación de biopelícula y adherencia a células epiteliales, el 75% fue productor de mucoviscosidad y sólo uno (4%) presentó resistencia a la fagocitosis. El 25% de las cepas aisladas fueron multirresistentes y el 62.5% de las mismas fueron productoras de BLEE. Al momento del aislamiento el 45.8% de los pacientes se encontraba en alguna de las unidades de cuidados intensivos y el 33.3% de los pacientes eran hemato-oncológicos. El 95.8% de los pacientes tuvieron algún tipo de antibioticoterapia previa y el 100% contaba con presencia de catéter venoso central.

Conclusión. Las cepas estudiadas de *Klebsiella pneumoniae* presentaron en su mayoría todos los factores de virulencia, los cuales hacen que la misma sea un patógeno relevante en las infecciones nosocomiales. Es importante el hecho de la presencia de un dispositivo externo (CVC) en todos los pacientes con aislamiento de esta bacteria, lo cual nos lleva a observar la gran importancia del manejo y cuidado de dichos dispositivos.

ANTECEDENTES

Las infecciones nosocomiales son de los principales problemas de salud pública que afectan a los pacientes en todos los hospitales a nivel mundial. *Klebsiella pneumoniae* es un patógeno de adquisición hospitalaria con el potencial de ocasionar morbilidad y mortalidad severa en pacientes pediátricos. Así mismo, la presencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) ha constituido un importante mecanismo de resistencia antimicrobiana entre los patógenos Gram-negativos nosocomiales. La prevalencia más elevada de *K. pneumoniae* productora de BLEE (Kp-BLEE) a nivel mundial ha sido observada en América Latina [1]. En México, Kp-BLEE la mayoría de las ocasiones se ha reportado ocasionando epidemias en unidades de cuidados intensivos neonatales [2].

Las infecciones nosocomiales más comunes en la población pediátrica son las infecciones relacionadas con las líneas vasculares, neumonías, infecciones del sitio quirúrgico e infecciones del tracto urinario. Estas infecciones pueden proceder de fuentes endógenas o exógenas. En las unidades de cuidados intensivos, las infecciones más frecuentes son las relacionadas con la presencia de un dispositivo, como la infección relacionada con las líneas vasculares o intravasculares (28%), la neumonía por el uso de ventilación mecánica (21%) y la infección de vías urinarias relacionadas con el uso de sondas (15%) [3].

En un informe de la Secretaria de Salud se investigó la prevalencia de las infecciones nosocomiales en hospitales generales del IMSS, ISSSTE y de la SSA, siendo esta de un 21% y no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las instituciones. En nuestro hospital se realizó un estudio para identificar la tendencia de las infecciones nosocomiales durante un periodo de 12 años. Las infecciones más frecuentes fueron las relacionadas con la línea vascular (15.4%), la neumonía relacionada con la ventilación mecánica (17.9%), la infección de sitio quirúrgico (10.3%) y la infección de vías urinarias (6.8%). Así mismo, los servicios con mayores tasas fueron neonatología, terapia intensiva pediátrica, pediatría médica y neurocirugía. La letalidad de la infección nosocomial fue de 4.5% [3].

La infección nosocomial neonatal más frecuente es la bacteriemia (entre 21 y 56%), seguida de la neumonía (13.9 y 30%). Las bacterias grampositivas, como los *Staphylococcus* coagulasa negativa son los microorganismos más frecuentes (55.4%), seguidas por las gramnegativas, como *Enterobacter*, *Klebsiella* sp. y *Escherichia coli* (aproximadamente 31.2%). En un estudio en la unidad de cuidados intensivos neonatales de nuestra unidad se observó que las infecciones nosocomiales más frecuentes fueron bacteriemia relacionada con la colonización del catéter venoso central (35.5%) y la sepsis (28.8%). Los principales microorganismos fueron los *Staphylococcus* coagulasa negativa (43.4%), todos resistentes a metilina, y *Klebsiella pneumoniae* (21%); 97.3 % de estos era productor de betalactamasas de espectro extendido [2].

A nivel mundial se ha notado un incremento de Enterobacterias productoras de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE). Las cepas productoras de BLEE no solo han sido aisladas de infecciones adquiridas en la comunidad o de origen nosocomial, sino también de las bacterias entéricas de niños sanos. Mientras el 11.8% de las bacteriemias causadas por *E. coli* y *K. pneumoniae* fueron ocasionadas por cepas productoras de BLEE en niños hospitalizados, las cepas productoras de BLEE ocupan una mayor proporción en los aislamientos de pacientes inmunocomprometidos. En estudios previos a nivel mundial, aislamientos de *K. pneumoniae* productora de BLEE en bacteriemias fue de 51.6% en niños con enfermedades hematooncológicas [4].

En un estudio reciente realizado por De la Cruz y cols en un periodo de tres años en nuestra institución mostró el aislamiento en hemocultivos de *K. pneumoniae* (30.4%) vs *Escherichia coli* (18.9%); así mismo mostrando el 45% de estas resistencia antimicrobiana a cefalosporinas [5].

En años recientes se ha visto incremento del índice de resistencia antimicrobiana en *K. pneumoniae*, más notablemente en cepas productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) [6]. Aunque algunos estudios hospitalarios han notado un alto índice de ocurrencia de enfermedades concomitantes y un índice de fatalidad del 20 al 40%, el índice de mortalidad y los

factores de riesgo para adquirir o morir por una bacteriemia por *K. pneumoniae* no han sido definidos en una población pediátrica de nuestro país.

Por lo anterior y no habiendo estudios específicos acerca de los factores de virulencia de cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de los pacientes pediátricos con bacteriemias en nuestro hospital es importante conocer sus características; ya que *K. pneumoniae* es una de las bacterias gramnegativas aisladas con mayor frecuencia en las infecciones nosocomiales en nuestro hospital.

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no móvil y capsulado perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está presente de manera ubicua en el ambiente y es saprófito natural del tracto gastrointestinal y de la nasofaringe en humanos y animales .

K. pneumoniae es considerado uno de los patógenos oportunistas más importantes, asociándose frecuentemente a infecciones del tracto urinario y a neumonía en personas sanas [7]. Sin embargo, en personas inmunocomprometidas puede ocasionar infección biliar, peritonitis, meningitis, septicemia y abscesos hepáticos [8]. Además, es una de las bacterias aisladas con mayor frecuencia de pacientes, tanto adultos como pediátricos, con infección nosocomial en diferentes regiones del mundo incluyendo América Latina [5, 9].

Una de las características más importantes de *K. pneumoniae* es su alta resistencia a los antibióticos, principalmente a los beta-lactámicos y esto debido principalmente a la producción de enzimas beta-lactamasas, las cuales hidrolizan a dichos antibióticos inhibiendo su actividad [10]. En la última década se han detectado en todo el mundo cepas de *K. pneumoniae* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido y de carbapenasas lo que ha originado un problema serio en el tratamiento de las infecciones causadas por este microorganismo [11].

La epidemiología de *K. pneumoniae* resistente a los antibióticos varía entre hospitales y zonas geográficas. Algunos brotes son causados por cepas únicas y otros se deben aparentemente a casos por transferencia horizontal de plásmidos que pueden conferir resistencia a múltiples antimicrobianos [12].

Factores de virulencia de *K. pneumoniae*

K. pneumoniae al ser un microorganismo oportunista sólo se convierte en patógeno cuando alcanza tejidos que normalmente son estériles o cuando afecta a pacientes inmunocomprometidos. Los principales factores implicados en la virulencia de *K. pneumoniae* son: los pilis, la cápsula de polisacárido, los sideróforos y el lipopolisacárido (LPS), los cuales le permiten a la bacteria entrar y multiplicarse en el hospedero (Figura 1) [13].

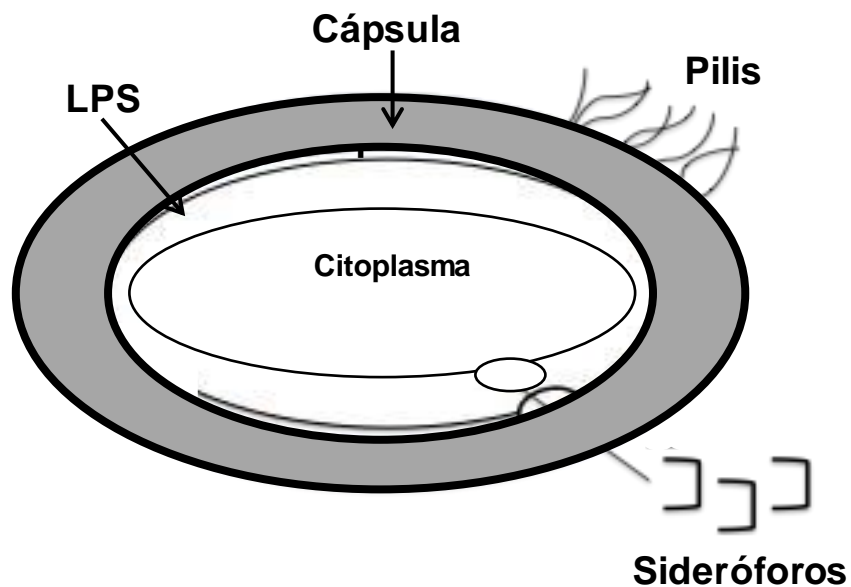


Figura 1. Factores de virulencia de *K. pneumoniae*. Se muestran los pilis, la cápsula, el lipopolisacárido (LPS) y los sideróforos, los cuales son considerados los principales factores de virulencia. Adaptado de Podschun y Ullman, 1998

La primera etapa en el proceso infeccioso es la adherencia del agente a las células del hospedero, función que en casi todas las enterobacterias es desempeñada por unas proyecciones filamentosas de la superficie bacteriana

llamadas pilis. Los pilis o fimbrias son estructuras filamentosas no flagelares que permiten la adherencia de la bacteria sobre superficies bióticas y abióticas. Los principales pilis descritos en *K. pneumoniae* son: el pili tipo 1, el pili tipo 3 y el pili ECP. Diferentes estudios han demostrado que estos pilis son importantes para la adherencia de la bacteria a las células epiteliales del tracto intestinal, urinario y respiratorio. Además, se ha demostrado que el pili tipo 3 es indispensable para la formación de biopelículas sobre placas de poliestireno y catéteres [14, 15].

Las cepas de *K. pneumoniae* se caracterizan por poseer una cápsula de polisacárido, la cual está compuesta principalmente por glucosa, galactosa, fructuosa, manosa, ramnosa y ácidos urónicos. Esta cápsula es importante para la bacteria ya que le permite evadir al sistema inmunológico impidiendo la fagocitosis [16]. Las diferencias en la composición de la cápsula de polisacárido permite clasificar a las diferentes cepas de este género en 77 serotipos, según el antígeno capsular (K) que poseen [17].

Los sideróforos constituyen otro factor de virulencia en *K. pneumoniae* ya que permiten captar hierro bajo condiciones limitantes de dicho metal en el hospedero. El hierro es un factor esencial para el crecimiento bacteriano funcionando principalmente como catalizador de reacciones de óxido-reducción de proteínas que participan en transporte de electrones y oxígeno [18]. La aerobactina, la enterobactina y la yersiniobactina son los sideróforos de mayor importancia en esta bacteria, los cuales le proporcionan la capacidad para replicarse y mantener una infección local o sistémica [19].

El LPS tiene actividad endotóxica debido al lípido A que provoca la activación de los macrófagos e induce una respuesta inflamatoria con un efecto pirogénico. Por otro lado, las cadenas de polisacárido del antígeno O facilitan el proceso inicial de adherencia y confieren resistencia a la bacteria contra la actividad bactericida del suero no inmune [18]. En *K. pneumoniae* se han descrito nueve serotipos diferentes basados en el antígeno O: O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 y O12, de los cuales el serotipo O1 es el más frecuente en los aislados clínicos de *K.*

pneumoniae [20]. Algunos estudios indican que la estructura del LPS podría estar implicada en la virulencia de las bacterias Gram negativas incluyendo a *K. pneumoniae*, de acuerdo a su variación para expresar diferentes antígenos de superficie [21].

El pili tipo 3 y su relación con la patogenicidad en *K. pneumoniae*

El pili tipo 3 de *K. pneumoniae* juega un papel importante en la patogenicidad de acuerdo a diversos estudios que han demostrado su relevancia en la adherencia a células eucariotas y durante la formación de biopelículas [14, 22].

En un estudio se demostró que el pili tipo 3 es un importante factor de virulencia involucrado en la colonización de catéteres siliconados implantados en vejigas de ratones, sugiriendo que es necesario para la formación de biopelículas, las cuales son un foco de diseminación bacteriana que puede dar origen a las infecciones nosocomiales de vías urinarias debidas a este microorganismo [15]. Este mismo efecto de colonización de *K. pneumoniae* en catéteres de vías urinarias puede extrapolarse a catéteres de diferentes vías (venosa, arterial, cerebroespinal) que de igual manera al ser colonizados pueden dar origen a infecciones nosocomiales sépticas [23].

El pili tipo 3 de *K. pneumoniae* y la formación de biopelículas

Una característica muy importante para la patogenicidad de *K. pneumoniae* es la formación de biopelículas. Una biopelícula bacteriana consiste en un agregado de células contenidas dentro de una matriz de polisacáridos de superficie, proteínas y DNA. La habilidad para producir biopelícula resulta en resistencia incrementada a los factores del defensa del hospedero y de antimicrobianos, y ha sido reconocida como una propiedad importante de virulencia. Aun en ausencia de un cuerpo extraño, la formación de biopelícula ha sido mostrada como un factor en infecciones cerradas [24].

Las biopelículas se forman cuando las bacterias se adhieren y continúan proliferando hasta formar un agregado que constituye una microcolonia. Estos

agregados mantienen su estructura debido a la matriz que los rodea, la cual se compone principalmente de pilis y una matriz de proteínas no fimbriales y polisacáridos. Una vez que las biopelículas han alcanzado madurez, algunas bacterias se liberan para colonizar otras superficies, proceso denominado desprendimiento o dispersión [25].

El primer paso para la formación de las biopelículas, es la adherencia de la bacteria sobre la superficie, la cual es facilitada en la mayoría de las enterobacterias por pilis y otras adhesinas no fimbriales de la superficie que dan lugar a interacciones bacteria-bacteria y bacteria-superficie. Las bacterias que encuentran la superficie conveniente, forman con ella una unión reversible mediada por atracciones electrostáticas o hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals [26]. Una vez adheridas, las bacterias comienzan a proliferar dando origen a la formación de microcolonias, las cuales una vez establecidas generan estructuras tridimensionales complejas mediante la producción de una matriz extracelular compuesta predominantemente de polisacáridos [27]. La liberación final de las bacterias de la biopelícula es el proceso que menos se conoce y los detalles exactos de la dispersión para volver al estado planctónico no se han aclarado.

1.4 La cápsula de *K. pneumoniae*

La cápsula de *K. pneumoniae* es una estructura compleja y gruesa compuesta de polisacáridos que llega a medir hasta 160 nm de ancho. Los genes que codifican para la cápsula de *K. pneumoniae* varían de acuerdo al serotipo capsular, variando de 16 a 20 genes, los cuales están organizados en tres unidades transcripcionales consecutivas que dan origen a un gran número de proteínas involucradas en la biosíntesis y exportación de los componentes de dicha estructura molecular sobre la superficie bacteriana .

La cápsula de *K. pneumoniae* le proporciona una alta resistencia a la desecación así como protección frente a la fagocitosis mediada por los polimorfonucleares y macrófagos [28]. Además, estudios *in vitro* han demostrado que la cápsula de *K. pneumoniae* inhibe el depósito del componente C3 del complemento sobre la

superficie de la bacteria reduciendo la formación del complejo de ataque a la membrana [29].

RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

En la gran mayoría de los casos *K. pneumoniae* es resistente a ampicilina por medio de la presencia de β -lactamasa SHV-1, codificada en el cromosoma de bacteria. A partir de los años 80 la aparición y uso de nuevos antibióticos capaces de evadir la resistencia por este tipo de enzima, promovió la aparición de cepas resistentes a ellos, y fue así como se reportó la resistencia transferible a cefalosporinas de 3ra generación. Además en el año de 1985 se reportó la mutación de la SHV-1, produciendo una nueva enzima (SHV-2), causante de la resistencia de *Klebsiella ozaenaea* a las cefalosporinas de amplio espectro, y de allí su denominación como BLEE [30]. Como los genes que codifican estas B-lactamasas son transportados por plásmidos, su transmisión a otras especies y géneros bacterianos se produjo rápidamente. Las consecuencias clínicas de la resistencia ocasionadas por las infecciones cuyo agente etiológico es este tipo de bacterias se reflejan en el incremento de la estancia hospitalaria, la mortalidad y los costos de la atención médica. El problema de resistencia a antibióticos ha alcanzado tal dimensión que estudios epidemiológicos de resistencia han reportado porcentajes de *K. pneumoniae* productoras de BLEE que pueden llegar hasta el 60% dependiendo del país y del hospital estudiado [31].

En las enterobacterias la resistencia a los carbapenémicos puede presentarse por tres mecanismos. En primer lugar, la hiperproducción de AmpC en asociación con la pérdida de porinas de la membrana externa puede producir resistencia a los carbapenémicos. El segundo mecanismo corresponde a cambios en la afinidad de las “enzimas blanco” (proteínas a las cuales se unen las penicilinas) para los carbapenémicos. El tercer mecanismo es la producción de una β -lactamasa que sea capaz de hidrolizar los carbapenémicos.

JUSTIFICACIÓN

K. pneumoniae es un patógeno nosocomial emergente de alta importancia epidemiológica. No hay estudios específicos acerca de los factores de virulencia de cepas de *K. pneumoniae* aisladas de los pacientes pediátricos con bacteriemias en nuestro hospital, por lo que el estudio de sus características patogénicas nos ayudarán a comprender su comportamiento en las diferentes patologías.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a su frecuencia y a los mecanismos de patogenicidad y de resistencia antimicrobiana que puede presentar *K. pneumoniae*, se ha considerado como una bacteria de gran importancia en la etiología de infecciones asociadas a instituciones hospitalarias o adquiridas en la comunidad, para lo cual es importante conocer los factores de virulencia asociados a este microorganismo.

No hay estudios específicos de los factores de virulencia de *K. pneumoniae* en aislados de pacientes de nuestro hospital. De ahí que la pregunta de investigación fue:

*¿Cuáles son los fenotipos de virulencia de *K. pneumoniae* en aislados de hemocultivos de pacientes de nuestro hospital?*

*¿Cuál es el perfil de resistencia a antibióticos de *K. pneumoniae* en aislados de hemocultivos de pacientes de nuestro hospital? ¿Cuántos son multirresistentes?*

*¿Qué porcentaje de las *K. pneumoniae* aisladas serán productoras de BLEE?*

HIPÓTESIS

Las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de pacientes con bacteriemia, mostrarán características de virulencia como la formación de biopelícula, hipermucoviscosidad y adherencia a células epiteliales.

Tendremos un alto número de cepas multirresistentes.

La multiresistencia a antibióticos de las cepas aisladas de *K. pneumoniae* es independiente de sus fenotipos de virulencia (biopelícula, hipermucoviscosidad y adherencia a células epiteliales).

Más del 90% de las cepas aisladas serán productoras de BLEE.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

- 1.- Determinar los factores de virulencia de *K. pneumoniae* en aislados de hemocultivos de pacientes pediátricos de nuestro hospital.
- 2.- Determinar el perfil de resistencia de las cepas aisladas de *K. pneumoniae* de pacientes pediátricos de nuestro hospital y determinar el número de cepas multirresistentes.
- 3.- Determinar qué porcentaje de cepas son productoras de BLEE.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Todas las cepas de *K. pneumoniae* aisladas de hemocultivos durante el periodo del 1 de Enero de 2013 a 31 de Diciembre de 2013.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

Ninguno

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

LUGAR DONDE SE REALIZARÁ EL ESTUDIO: Laboratorio de Microbiología Molecular, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

TIPO DE ESTUDIO: Transversal descriptivo.

VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	UNIDAD DE MEDICION /CATEGORIA
Patología de base	Trastorno anatómico y fisiológico de los tejidos y los órganos enfermos.	Se determinará en hematológica, oncológica, endocrina, respiratoria, gastrointestinal.	CUALITATIVA	NOMINAL	NA
Edad del paciente	Edad cronológica del paciente	Edad del paciente al momento de la toma del hemocultivo	CUANTITATIVA	CONTINUA	Meses
Sexo	Conjunto de características biológicas que definen al espectro de humanos como hembras y machos.	Definir si el paciente es género masculino o femenino.	CUALITATIVA	NOMINAL	Femenino Masculino
Unidad donde se encontraba hospitalizado el paciente	Lugar donde se encontraba hospitalizado el paciente (Piso de Pediatría o Unidad de Terapia Intensiva)	Lugar donde se encontraba hospitalizado el paciente (Piso de Pediatría o Unidad de Terapia Intensiva) al momento de la toma del hemocultivo	CUALITATIVA	NOMINAL	NA
Uso de catéter central	Uso de dispositivos intravasculares en vena central o umbilical	Uso de dispositivos intravasculares en vena central o umbilical al momento de la toma del hemocultivo	CUALITATIVA	NOMINAL DICOTÓMICA	1= Si 0= No

Ventilación mecánica	Soporte ventilatorio mecánico	Uso de soporte ventilatorio mecánico al momento de la toma del hemocultivo	CUALITATIVA	NOMINAL DICOTÓMICA	1= Si 0= No
Nutrición parenteral	Uso de nutrición por vía intravenosa	Uso de nutrición por vía intravenosa al momento del hemocultivo	CUALITATIVA	NOMINAL DICOTÓMICA	1= Si 0= No
Formación de Biopelícula	Agregado de células contenidas dentro de una matriz de polisacáridos de superficie, proteínas y DNA.	Mecanismo de resistencia en el que las bacterias se adhieren y continúan creciendo formando una comunidad bacteriana embebida en una matriz de exopolisacárido. Absorbancia (Unidades arbitrarias)	CUALITATIVA	NOMINAL	1= Si 0= No
Hipermucoviscosidad	Capacidad de las bacterias para formar moco de características viscosas, producido por el polisacárido capsular.	La mucoviscosidad de las cepas en estudio será determinada mediante el método de centrifugación a baja velocidad.	CUANTITATIVA	NUMERICA CONTINUA	1= Si 0= No
Adherencia a células epiteliales	Capacidad de la bacteria para adherirse a las células.	Cuantificación del número de bacterias adheridas a una monocapa de células epiteliales.	CUANTITATIVA	NUMERICA CONTINUA	UFC/ml
Fagocitosis mediada por macrófagos	Capacidad del macrófago para internalizar a las	Cuantificación del número de bacterias	CUANTITATIVA	NUMERICA CONTINUA	UFC/ml

	bacterias patógenas.	fagocitas por el macrófago.			
Resistencia a antibióticos	Capacidad de un microorganismo para crecer en presencia de un antimicrobiano a dosis terapéutica.	Determinar a cuales antibióticos es resistente el microorganismo.	CUALITATIVA	NOMINAL	1= SENSIBLE 0= RESISTENTE
Multiresistencia a antibióticos	Microorganismo que son resistentes a una o más clases de antibióticos. Debe existir resistencia a más de una familia o grupo de antimicrobianos y que esa resistencia tenga relevancia clínica y epidemiológica.	Determinar si son resistentes a tres o más familias de antibióticos, a los que habitualmente son sensibles.	CUALITATIVA	NOMINAL	1= Si 0= No
BLEE (Betalactamasas de espectro extendido)	Familia de enzimas producidas por bacilos gramnegativos como mecanismo de resistencia bacteriana y confiere resistencia a un gran número de antibióticos entre ellas penicilinas y cefalosporinas.	Determinar si hubo producción de BLEE.	CUALITATIVA	NOMINAL	1= Si 0= No

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material Biológico

Cepas de *K. pneumoniae* obtenidas de hemocultivos.

2. Formación de biopelículas

La capacidad de formación de biopelículas fue evaluada con la metodología propuesta por Saldaña y colaboradores [32].

A partir de cultivos de las cepas en estudio crecidas toda la noche en medio LB (10 g/L de peptona de caseína, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl) a 37°C y en agitación a 200 rpm, se inocularon 10 µL en 990 µL de medio LB fresco. Posteriormente, se colocaron 100 µL de tal suspensión bacteriana en un pozo de una placa de poliestireno (Costar) de 96 pozos; dicho procedimiento se realizó por quintuplicado para cada cepa en estudio. Las placas se taparon e incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas.

Después del período de incubación, se removieron las células planctónicas con una micropipeta y se realizaron 3 lavados con 200 µL de PBS 1X. A continuación, se adicionaron 100 µL de cristal violeta al 1% y se dejó incubando a 37°C por 20 min. A continuación, se retiró el cristal violeta y se lavó de nuevo 3 veces con 200 µL de PBS 1X. Se dejaron secar las biopelículas y posteriormente fueron solubilizadas con 100 µL de etanol al 70% durante 5 min.

La cantidad de cristal violeta adherida a la biopelícula fue cuantificada mediante espectrofotometría en el lector Multiskan (Costar) determinando la DO a 600 nm.

3. Determinación de la mucoviscosidad

La mucoviscosidad de las cepas en estudio se determinó mediante el método de centrifugación a baja velocidad [33].

A partir de cultivos en fase exponencial de crecimiento se tomaron 2 mL y se colocaron en microtubos para posteriormente centrifugarlos a 500 xg durante 5 min. En seguida, se recolectaron 800 µL de los sobrenadantes, los cuales se leyeron en un espectrofotómetro obteniendo la absorbancia a 600 nm.

4. Evaluación de la adherencia a células epiteliales A549

4.1 Cuenta viable del cultivo utilizado para la infección

A partir de un cultivo de *K. pneumoniae* en medio LB en la fase logarítmica de crecimiento se realizó la cuenta viable mediante la realización de diluciones decimales desde 10^{-1} hasta 10^{-6} en PBS 1X estéril; posteriormente se inocularon 20µl de cada dilución por triplicado en placas de agar LB, después las placas se incubaron durante 18 h a 37°C y se procedió a contar las colonias para calcular las UFC/mL.

4.2 Obtención de neumocitos

Los neumocitos humanos de la línea celular A549 ATCC CCL-2185 se descongelaron y se mantuvieron en medio RPMI (Gibco) [2.0 g/L de glucosa, 0.4 g/L de KCl, 0.1 g/L de MgSO₄, 6 g/L de NaCl, 2 g/L de NaHCO₃, 0.8 g/L de Na₂HPO₄, 0.1 g/L de Ca(NO₃)₂, 0.001 g/L de glutatión, 0.3 g/L de L- glutamina, 25 mM de HEPES y 0.005 g/L de rojo de fenol] al 10% de suero fetal bovino (SFB) incubándose a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 48 h en botellas para cultivo celular de 75 cm². Posteriormente, se retiró el medio de cultivo dejando la monocapa en la botella y se adicionaron 7.5 mL de una solución de Tripsina al 0.5% en EDTA al 0.2% (Sigma) con la finalidad de levantar la monocapa celular. Se recolectaron los 7.5 mL y se colocan en un tubo cónico estéril y se centrifugan

a 1000 xg durante 7 min. Posteriormente, se recolectó y se descartó el sobrenadante y se adicionaron 5 mL de medio RPMI al 10% de SFB.

4.3 Cuenta viable de neumocitos

Los neumocitos del punto anterior se diluyeron (1:20) con azul de tripano al 0.2% y esta suspensión se colocó en una cámara de Neubauer para la cuenta celular.

Una vez obtenida la cuenta de las células viables en los cuatro cuadrantes externos; se calculó el número de células por mL, este cálculo se obtuvo multiplicando el número promedio de células por el factor de dilución y por el factor de la cámara de Neubauer (10,000), esto para obtener los neumocitos requeridos para las infecciones posteriores.

Se utilizaron placas estériles de plástico especiales para cultivo celular (Costar) y se colocaron en cada pozo lo correspondiente a 1×10^6 células, las cuales se incubaron a 37°C al 5% de CO₂ durante 24 horas.

4.4 Infección de los neumocitos con *K. pneumoniae*

Las infecciones se realizaron por triplicado y en tres experimentos independientes. Se infectaron los neumocitos con las diferentes cepas aisladas con una multiplicidad de infección (MOI) de 100. Las placas se incubaron a 37°C al 5% de CO₂ durante 2 h. Una vez transcurrido el periodo de incubación se retiró el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. A cada pozo se le adicionaron 1 mL de Tritón X-100 al 0.1% y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, se raspó con la punta de una micropipeta y se recolectó el lisado celular para depositarlo en un microtubo estéril. A partir de los lisados celulares que contienen a las bacterias se realizaron diluciones decimales seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-5} para posteriormente inocular en placas de agar LB de cada microtubo 20 µL de la suspensión por triplicado.

Las placas de agar LB inoculadas se incubaron a 37°C durante 18 h y se realizó el conteo de las colonias para determinar las UFC/mL.

5. Evaluación de la fagocitosis con macrófagos THP-1

5.1 Cuenta viable del cultivo utilizado para la infección

La cuenta viable del cultivo se determinó como en el punto 5.1

5.2 Obtención de monocitos

Los monocitos humanos de la línea celular THP-1 ATCC TIB-202 se mantuvieron en medio RPMI (Gibco) al 10% de SFB, 0.4% de glucosa y 0.5 mM de β -mercaptoetanol, y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 48 h.

5.3 Diferenciación de los monocitos a macrófagos

La diferenciación de los monocitos consistió en dos etapas: la cuenta de los monocitos y el periodo de diferenciación. Primero se realizó la cuenta de monocitos para obtener una monocapa reproducible. El primer paso de esta cuenta celular consistió en centrifugar los monocitos a 800 rpm por 5 min, posteriormente el botón celular obtenido se lavó con PBS 1X estéril, para eliminar residuos del medio de crecimiento; después, se centrifugaron nuevamente las células en las mismas condiciones mencionadas y se eliminó el sobrenadante para adicionar medio RPMI al 10% de SFB y se ajustó a un volumen final de 5 mL. Finalmente, se realizó una dilución (1:20) del cultivo celular con azul de tripano al 0.2% y esta suspensión se colocó en una cámara de Neubauer para la cuenta celular.

Una vez obtenida la cuenta de las células viables en los cuatro cuadrantes externos; se calculó el número de células por mL, este cálculo se obtuvo multiplicando el número promedio de células por el factor de dilución y por el factor de la cámara de Neubauer (10,000), esto para obtener los monocitos requeridos para las infecciones posteriores.

Se realizó una suspensión para la diferenciación de los monocitos, tomando una alícuota del cultivo celular correspondiente a la cantidad requerida de monocitos

para las infecciones y se le adicionó medio RPMI al 10% de SFB y acetato de forbol miristato (PMA) a una concentración final de 20 nM.

Se utilizaron placas estériles de plástico especiales para cultivo celular (Costar) de 24 pozos. En cada pozo se colocaron 500µl de cultivo celular y se incubaron a 37°C, en atmósfera de CO₂ al 5% por 24h. Transcurrido el período de incubación se les retiró el medio con PMA y se les adicionó a cada pozo 1000 µL de medio RPMI con SFB al 3%.

5.4 Infección de macrófagos con *K. pneumoniae*

Una vez obtenida una monocapa confluyente de 1×10^6 macrófagos por pozo y haber cambiado el medio, se prosigió a infectar con las cepas en estudio de *K. pneumoniae*, cada pozo se infectó con una MOI de 100 y para cada cepa se realizó la infección por triplicado en tres experimentos independientes. Las placas se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 2 h.

Pasado el período de incubación, se retiró el medio de cultivo celular y la monocapa de cada pozo se lavó 3 veces con PBS 1X estéril, a continuación se adicionó en cada pozo 1 mL de medio RPMI con gentamicina a una concentración final de 100 µg/mL y se incubó a 37°C al 5% de CO₂ durante 1 h con la finalidad de eliminar las bacterias extracelulares.

Posteriormente, se retiraron de los pozos el medio RPMI con gentamicina y se lavaron 3 veces las monocapas con PBS 1X estéril. A cada pozo se le adicionó 1 mL de Tritón X-100 al 0.1% y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, se raspó con la punta de una micropipeta y se recolectó el lisado celular para depositarlo en un microtubo estéril. A partir de los lisados celulares que contienen a las bacterias se realizaron diluciones decimales seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-5} para posteriormente inocular en placas de agar LB de cada microtubo 20 µL de la suspensión por triplicado.

Las placas de agar LB inoculadas se incubaron a 37°C durante 18 h y se realizó el conteo de las colonias para determinar las UFC/MI

RESULTADOS

En este estudio fueron analizadas un total de 24 cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de hemocultivos de pacientes pediátricos del hospital de pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI.

El 33.3% de los pacientes con dichos aislamientos eran del sexo femenino y 66.6% del sexo masculino. Al momento del aislamiento el 45.8% de los pacientes se encontraba en alguna de las unidades de cuidados intensivos y el 33.3% de los pacientes eran hemato-oncológicos, al igual que otro 33.3% correspondía a los servicios pediátricos, 12.5% con patología cardíaca y el resto correspondiente a los servicios de gastroenterología, cirugía y nefrología. El 95.8% de los pacientes tuvieron algún tipo de antibioticoterapia previa y el 100% contaba con presencia de catéter venoso central. El 37.5% se encontraba con presencia de ventilación mecánica asistida y el 25% con nutrición parenteral. (Tabla 1)

En cuanto a los factores de virulencia de la bacteria, el 100% de los aislamientos tuvo formación de biopelícula y adherencia a células epiteliales, el 75% fue productor de mucoviscosidad y sólo uno (4%) presentó resistencia a la fagocitosis (Gráfica 1-4). Dichos parámetros se obtuvieron de acuerdo a los resultados obtenidos por Ares et al 2016. El 25% de las cepas aisladas fueron multirresistentes y el 62.5% de las mismas fueron productoras de beta-lactamasa de espectro extendido. (Tabla 1)

En cuanto a la sensibilidad a antibióticos, se encontró una alta proporción de aislados con resistencia a ampicilina/sulbactam, cefazolina, ceftriaxona y cefepime (54, 66.6, 58 y 58.3%, respectivamente). Resistencia a aztreonam fue observada en el 62.5% de los aislamientos y trimetoprim/sulfametoxazol 37.5%. Las fluoroquinolonas tuvieron un alta sensibilidad (<4% de resistencia) y todos los carbapenémicos, piperacilina/tazobactam y tigercilina fueron activos contra todos los aislados estudiados. (Tabla 2)

Tabla 1. Datos clínicos y factores de virulencia de los aislamientos

CEPA	DATOS CLÍNICOS					FACTORES DE VIRULENCIA					
	PATOLOGIA	CVC	VMA	NPT	ANTIBIOTICOS PREVIOS	BIOPELICULA	MUCOVISCOSIDAD	ADHERENCIA	FAGOCITOSIS	MULTIRRESISTENCIA	BLEE
1	QUIRURGICA	SI	NO	SI	SI	BP	NEG	A	FF	NO	+
2	NEFROLOGIA	SI	NO	NO	SI	BP	M	A	FF	NO	+
3	PEDIATRIA	SI	SI	NO	SI	BP	M	A	FF	SI	+
4	GASTROENTEROLOGIA	SI	NO	SI	SI	BP	NEG	A	FF	SI	+
5	PEDIATRIA	SI	NO	SI	SI	BP	NEG	A	FF	NO	+
6	PEDIATRIA	SI	SI	NO	SI	BP	M	A	RF	NO	+
7	ONCOLOGIA	SI	SI	NO	SI	BP	NEG	A	FF	SI	+
8	ONCOLOGIA	SI	NO	NO	SI	BP	NEG	A	FF	NO	+
9	PEDIATRIA	SI	NO	NO	SI	BP	M	A	FF	NO	-
10	CARDIOLOGIA	SI	NO	NO	SI	BP	M	A	FF	NO	-
11	PEDIATRIA	SI	SI	NO	SI	BP	M	A	FF	NO	-
12	CARDIOLOGIA	SI	NO	NO	SI	BP	M	A	FF	NO	-
13	NEFROLOGIA	SI	SI	NO	SI	BP	M	A	FF	SI	+
14	HEMATOLOGIA	SI	NO	NO	SI	BP	M	A	FF	SI	+
15	ONCOLOGIA	SI	NO	SI	SI	BP	M	A	FF	NO	-
16	ONCOLOGIA	SI	SI	NO	SI	BP	M	A	FF	NO	+
17	HEMATOLOGIA	SI	SI	NO	SI	BP	M	A	FF	NO	-
18	HEMATOLOGIA	SI	SI	NO	SI	BP	M	A	FF	NO	-
19	NEFROLOGIA	SI	NO	NO	SI	BP	M	A	FF	NO	+
20	PEDIATRIA	SI	NO	NO	SI	BP	M	A	FF	SI	+
21	PEDIATRIA	SI	SI	NO	NO	BP	M	A	FF	NO	+
22	CARDIOLOGIA	SI	SI	SI	SI	BP	M	A	FF	NO	+
23	ONCOLOGIA	SI	NO	NO	SI	BP	NEG	A	FF	NO	-
24	PEDIATRIA	SI	NO	SI	SI	BP	M	A	FF	NO	-
TOTAL		100%	41%	25%	95.8%	BP: 100%	NEG: 6 (25%) M: 18 (75%)	A: 100%	FF 23 (96%) RF: 1 (4%)	MR: 6 (25%)	POS: 15 (62.5%) NEG: 9 (37.5%)

CVC: Catéter venoso central; VMA: Ventilación mecánica asistida; NPT: Nutrición parenteral

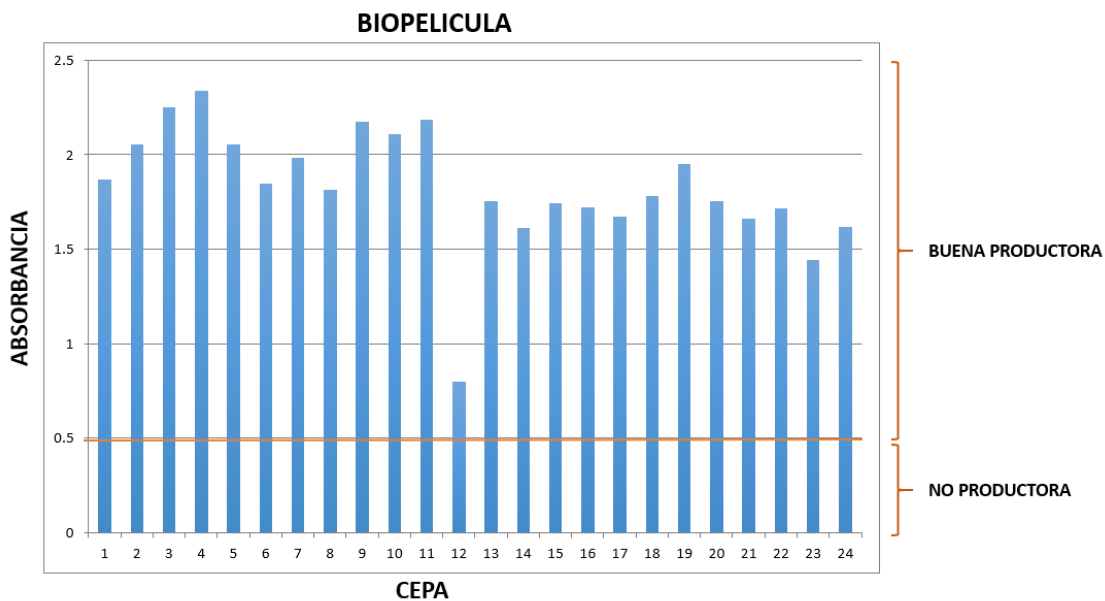
BP: buena productora

NEG: negativo, M: mucoviscosas

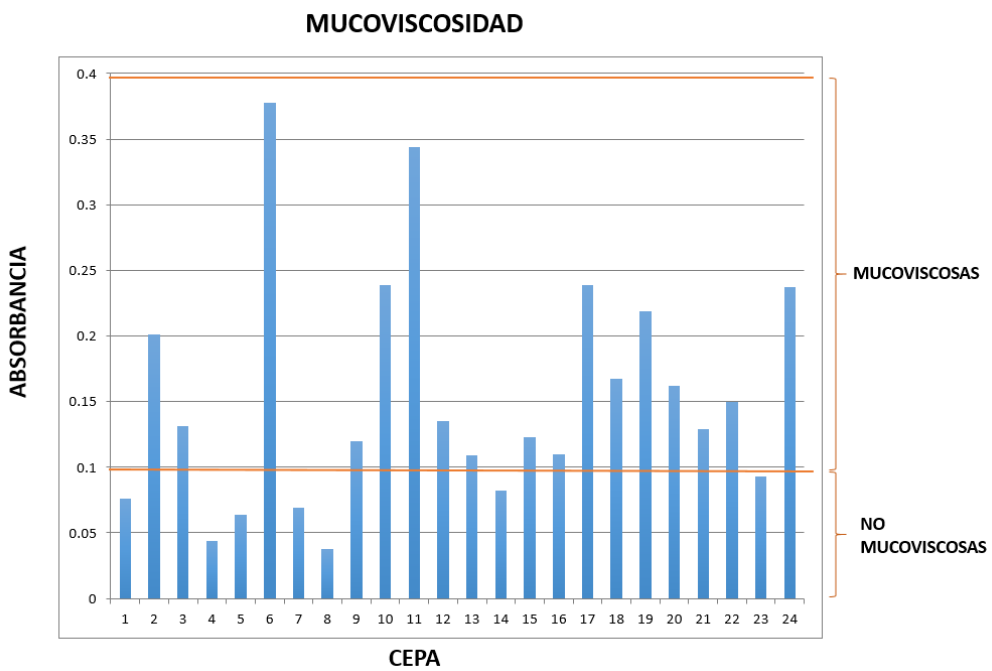
A: adherentes

FF: Fácilmente fagocitada; RF: Resistente a la fagocitosis

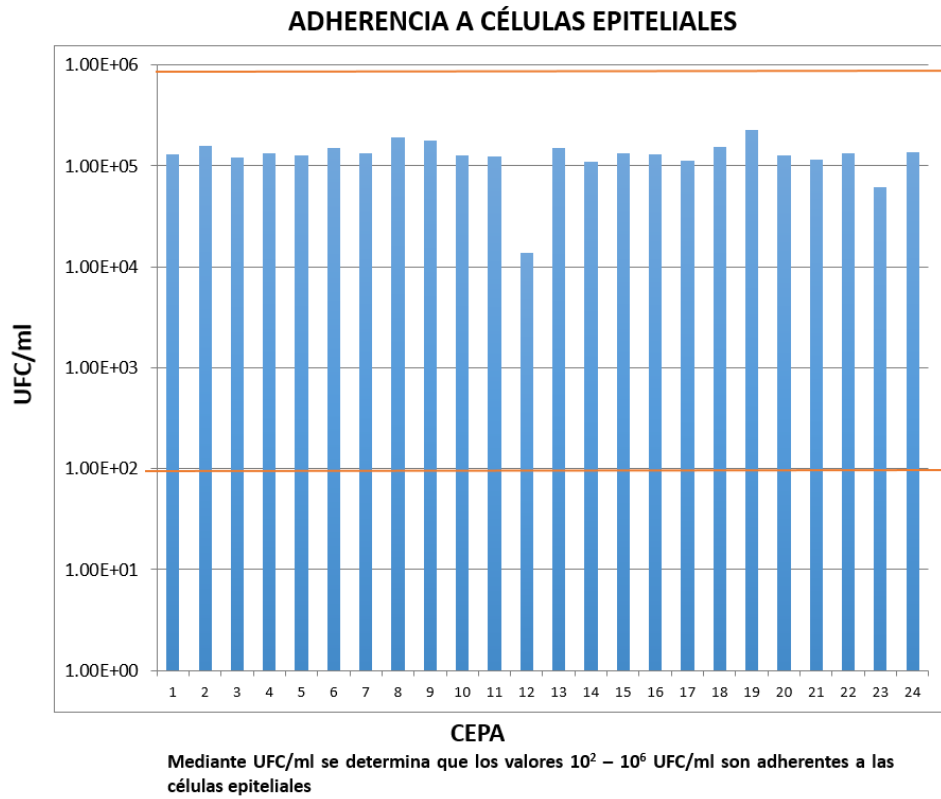
Gráfica 1- Formación de biopelícula



Gráfica 2- Producción de mucoviscosidad



Gráfica 3- Adherencia a células epiteliales



Gráfica 4- Evaluación de la fagocitosis

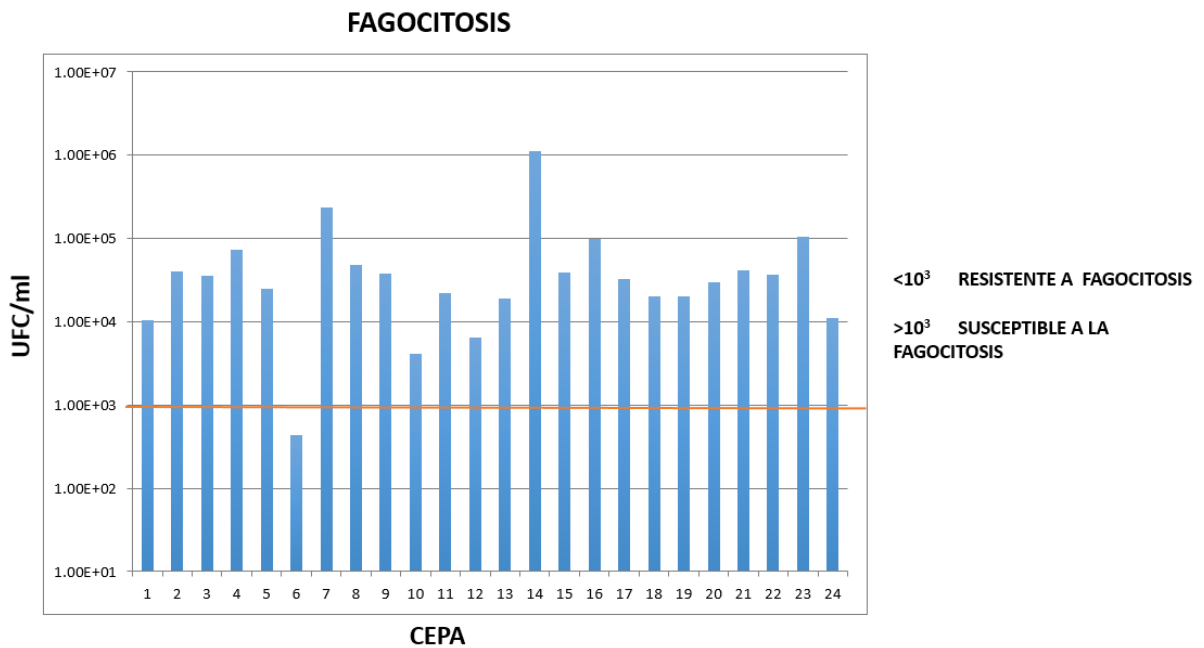


Tabla 2. Sensibilidad a antibióticos

	A/S	P/T	CEFAZ	CEFT	CEFEP	AZT	ERTA	IMI	MERO	AMI	GENTA	TOBRA	CIPRO	MOXI	TIGE	NITRO	TMS
1	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
2	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S
3	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	I	R
4	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	I	R
5	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S
6	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R
8	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R
9	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R
14	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	R
15	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
16	I	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
19	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S
20	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	R
21	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S
22	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S
23	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
24	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S

A/S: Ampicilina/Sulbactam; **P/T:** Piperacilina/Tazobactam; **Cefaz:** Cefazolina; **Ceft:** Ceftriaxona; **Cefep:** Cefepime; **Azt:** Aztreonam

Erta: Ertapenem; **Imi:** Imipenem; **Mero:** Meropenem

Ami: Amikacina; **Genta:** Gentamicina; **Tobra:** Tobramicina

Cipro: Ciprofloxacino; **Moxi:** Moxifloxacino

Tige: Tigercilina

Nitro: Nitrofurantoina

TMS: Trimetoprim/Sulfametoxazol

DISCUSIÓN

Las infecciones intrahospitalarias representan complicaciones debidas a múltiples factores de riesgo, algunos de los cuales son susceptibles de modificarse, mientras otros son inherentes a la terapia o al estado del paciente en sí.

Los factores de riesgo encontrados fueron presencia de catéter venoso central y uso previo de antibióticos. Estos resultados se podrían explicar por el uso inadecuado o indiscriminado de antibióticos sobre la microbiota usual hospitalaria y propia de cada paciente, y por otro lado el uso de dispositivos externos y las inadecuadas prácticas de cuidado de los mismos.

El sitio en donde se encontraban los pacientes al momento del diagnóstico fue en su mayoría de las unidades de cuidados intensivos, siendo estos el 45.8%. El 100% de los pacientes contaba con catéter venoso central y el 37.5% se encontraba con presencia de ventilación mecánica asistida. Estos factores concuerdan con lo encontrado por Zamudio-Lugo y colaboradores en nuestro hospital, cuando se realizó un estudio para identificar la tendencia de las infecciones nosocomiales, donde las infecciones más frecuentes fueron las relacionadas con la línea vascular (15.4%), la neumonía asociada con la ventilación mecánica (17.9%), la infección del sitio quirúrgico (10.3%) y la infección de vías urinarias (6.8%). En este mismo estudio, los servicios con mayores aislamientos fueron las áreas de cuidados intensivos tanto neonatal como pediátrica [3]. Igualmente mencionado en un estudio realizado por García y colaboradores en la unidad de cuidados intensivos neonatales de nuestra unidad, se observó que las infecciones nosocomiales más frecuentes fueron bacteriemia relacionada con la colonización del catéter venoso central (35.5%) y la sepsis (28.8%). Además, los microorganismos más prevalentes fueron los *Staphylococcus* coagulasa negativa (43.4%; 100% resistentes a meticilina), y *Klebsiella pneumoniae* (21%; 97.3 % productoras de betalactamasas de espectro extendido) [2]; motivo por el cual el interés de nuestra equipo por estudiar a este microorganismo Gram negativo y el porcentaje de BLEE positivas de nuestras

cepas siendo 62.5%, similar a lo encontrado en un estudio multicéntrico de infecciones nosocomiales urinarias y sanguíneas, en donde la frecuencia de *K. pneumoniae* fue de 65% (Alcántar D y cols, González-Vértiz, y cols).

En cuanto a factores de virulencia, las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE tienen fuerte impacto en el patrón de morbi-mortalidad y en los costos de hospitalización; ya que además se ha visto que la prevalencia más elevada de *K. pneumoniae* productora de BLEE a nivel mundial ha sido observada en América Latina y en México *K. pneumoniae* productora de BLEE ha sido mayormente reportado por ocasionar epidemias en unidades de cuidados intensivos neonatales como fue descrito por Mosqueda-Gómez y colaboradores; por lo tanto, es necesario una estricta implementación de medidas como el protocolo de lavado de manos, adecuadas técnicas de manejo de dispositivos médicos y el uso adecuado de antibióticos.

En cuanto al resto de los factores de virulencia, hubo formación de biopelícula y alta adherencia a células epiteliales en la totalidad de las cepas estudiadas, presentando mucoviscosidad en el 75% de ellas, y sólo encontrándose una cepa resistente a la fagocitosis. Es interesante que dicha cepa fue resistente a la fagocitosis, la cual correlacionó con la mayor mucoviscosidad, además de presentar formación de biopelícula y adherencia a células epiteliales en menor grado, no siendo multirresistente y BLEE+. Con respecto a las características clínicas, este paciente presentó una sepsis grave, llegando posteriormente a la recuperación sin otra complicación.

De los pacientes estudiados dos llegaron a la muerte a causa de choque séptico. El primero de ellos fue de sexo masculino con un año de edad y con síndrome de Goldenhart, coagulación intravascular diseminada, encontrándose en UTIP con aislamiento secundario a choque séptico secundario a peritonitis por perforación intestinal, portador de CVC y VMA, sin NPT y sin antibioticoterapia previa. En términos de factores de virulencia fue buen productor de biopelícula, mucoviscosa, adherente y fagocitada fácilmente, no fue multirresistente y BLEE+. Esto nos muestra presencia de tres de los factores de virulencia y presencia de factores de riesgo importantes, como lo son la presencia de catéter venosos central y

ventilación mecánica asistida; sin haber tenido antibioticoterapia previa, por lo cual probablemente no era multirresistente y si era BLEE+. El segundo masculino con un año de vida con síndrome de intestino corto secundario a atresia Intestinal IIIA, proveniente de su domicilio con aislamiento secundario a choque séptico secundario a *K. pneumoniae* y *E. faecalis* probablemente relacionada a colonización de CVC permanente y neumonía, con NPT y antibioticoterapia previa, sin VMA; en factores de virulencia fue buena productora de biopelícula, mucoviscosa, adherente y fagocitada fácilmente, no fue multirresistente y BLEE-. Este paciente contando de la misma manera con tres de los cuatro factores de virulencia estudiados y con presencia de factores de riesgo CVC permanente, nutrición parenteral y antibioticoterapia previa, lo cual lo hace más susceptible a infecciones y más aun con presencia de otro microorganismo además del estudiado, lo cual pudo haber influido en dicho desenlace.

Llama la atención la sensibilidad de todas las cepas a los carbapenémicos, tigercilina y ureidopenicilina y en su mayoría también a las fluoroquinolonas, y la incrementada resistencia de ampicilina y cefalosporinas, coincidiendo además estas cepas con la producción de BLEE. Este resultado coincide con lo encontrado por García y colaboradores en donde la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* fueron sensibles a carbapenémicos, quinolonas y piperacilina-tazobactam y resistentes al 100% a ampicilina y en 93.7% a cefotaxima.

Es importante al contar con los aislamientos de *K. pneumoniae* evaluar si el paciente cuenta con el tratamiento antibiótico adecuado para evitar resistencias. Asimismo al ser BLEE+ indicar el tratamiento óptimo, ya que el tratamiento antibiótico inicial en pacientes con bacteriemia por cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE se considera el principal factor de riesgo para aumento en mortalidad.

CONCLUSIÓN

Las cepas estudiadas de *Klebsiella pneumoniae* presentaron en su mayoría todos los factores de virulencia, los cuales hacen que la misma sea un patógeno relevante en las infecciones nosocomiales y pueda llegar a tener un incremento en la morbi-mortalidad de los pacientes con dicha bacteria, y más aún en las que son productoras de BLEE. Así mismo es importante el hecho de la presencia de un dispositivo externo (CVC) en todos los aislamientos de esta bacteria, lo cual nos lleva a observar la gran importancia del manejo y cuidado de dichos dispositivos. Este es el primer estudio descriptivo de las características clínicas y moleculares de aislados de hemocultivos de *K. pneumoniae* en pacientes pediátricos en nuestro país.

REFERENCIAS

1. Mosqueda-Gomez JL, Montano-Loza A, Rolon AL, Cervantes C, Bobadilla-del-Valle JM, Silva-Sanchez J, Garza-Ramos U, Villasis-Keever A, Galindo-Fraga A, Palacios GM *et al*: **Molecular epidemiology and risk factors of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* A case-control study.** *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 2008, **12**(6):653-659.
2. Garcia H, Martinez-Munoz AN, Peregrino-Bejarano L: **[Epidemiology of nosocomial infections in a neonatal intensive care unit].** *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 2014, **52 Suppl 2**:S30-37.
3. Zamudio-Lugo I, Espinosa-Vital GJ, Rodriguez-Sing R, Gomez-Gonzalez CJ, Miranda-Novales MG: **[Nosocomial infections. Trends over a 12 year-period in a pediatric hospital].** *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 2014, **52 Suppl 2**:S38-42.
4. Han SB, Jung SW, Bae EY, Lee JW, Lee DG, Chung NG, Jeong DC, Cho B, Kang JH, Kim HK *et al*: **Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in febrile neutropenic children.** *Microbial drug resistance* 2015, **21**(2):244-251.
5. Ares MA, Alcantar-Curiel MD, Jimenez-Galicia C, Rios-Sarabia N, Pacheco S, De la Cruz MA: **Antibiotic resistance of gram-negative bacilli isolated from pediatric patients with nosocomial bloodstream infections in a Mexican tertiary care hospital.** *Chemotherapy* 2013, **59**(5):361-368.
6. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA, International *Klebsiella* Study G: **Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003, **47**(11):3554-3560.
7. Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JD, Laupland KB: **Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia.** *The American journal of medicine* 2009, **122**(9):866-873.
8. Wu KM, Li LH, Yan JJ, Tsao N, Liao TL, Tsai HC, Fung CP, Chen HJ, Liu YM, Wang JT *et al*: **Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis.** *Journal of bacteriology* 2009, **191**(14):4492-4501.
9. Tsering DC, Das S, Adhiakari L, Pal R, Singh TS: **Extended Spectrum Beta-lactamase Detection in Gram-negative Bacilli of Nosocomial Origin.** *Journal of global infectious diseases* 2009, **1**(2):87-92.
10. Chong Y, Ito Y, Kamimura T: **Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.** *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2011, **11**(7):1499-1504.
11. Shields RK, Clancy CJ, Hao B, Chen L, Press EG, Iovine NM, Kreiswirth BN, Nguyen MH: **Effects of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Subtypes, Extended-Spectrum beta-Lactamases, and Porin Mutations on the In Vitro Activity of Ceftazidime-Avibactam**

- against Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015, **59**(9):5793-5797.
12. Manges AR: **Editorial Commentary: Genomic Epidemiology: Revealing Hidden Reservoirs for *Klebsiella pneumoniae***. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2015, **61**(6):900-902.
 13. Balestrino D, Ghigo JM, Charbonnel N, Haagensen JA, Forestier C: **The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides**. *Environmental microbiology* 2008, **10**(3):685-701.
 14. Alcantar-Curiel MD, Blackburn D, Saldana Z, Gayosso-Vazquez C, Iovine NM, De la Cruz MA, Giron JA: **Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation**. *Virulence* 2013, **4**(2):129-138.
 15. Murphy CN, Mortensen MS, Krogfelt KA, Clegg S: **Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections**. *Infection and immunity* 2013, **81**(8):3009-3017.
 16. Lee CH, Chang CC, Liu JW, Chen RF, Yang KD: **Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis**. *Virulence* 2014, **5**(6):673-679.
 17. Schembri MA, Blom J, Krogfelt KA, Klemm P: **Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae***. *Infection and immunity* 2005, **73**(8):4626-4633.
 18. Podschun R, Ullmann U: ***Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors**. *Clinical microbiology reviews* 1998, **11**(4):589-603.
 19. Russo TA, Olson R, MacDonald U, Beanan J, Davidson BA: **Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo**. *Infection and immunity* 2015, **83**(8):3325-3333.
 20. Hsieh PF, Wu MC, Yang FL, Chen CT, Lou TC, Chen YY, Wu SH, Sheu JC, Wang JT: **D-galactan II is an immunodominant antigen in O1 lipopolysaccharide and affects virulence in *Klebsiella pneumoniae*: implication in vaccine design**. *Frontiers in microbiology* 2014, **5**:608.
 21. Putker F, Bos MP, Tommassen J: **Transport of lipopolysaccharide to the Gram-negative bacterial cell surface**. *FEMS microbiology reviews* 2015.
 22. Di Martino P, Cafferini N, Joly B, Darfeuille-Michaud A: ***Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces**. *Research in microbiology* 2003, **154**(1):9-16.
 23. Niveditha S, Pramodhini S, Umadevi S, Kumar S, Stephen S: **The Isolation and the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs)**. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR* 2012, **6**(9):1478-1482.
 24. Bakaletz LO: **Bacterial biofilms in otitis media: evidence and relevance**. *The Pediatric infectious disease journal* 2007, **26**(10 Suppl):S17-19.
 25. Hobbey L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR: **Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes**. *FEMS microbiology reviews* 2015, **39**(5):649-669.
 26. Dunne WM, Jr.: **Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?** *Clinical microbiology reviews* 2002, **15**(2):155-166.

27. Joo HS, Otto M: **Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens.** *Chemistry & biology* 2012, **19**(12):1503-1513.
28. Nypaver CM, Thornton MM, Yin SM, Bracho DO, Nelson PW, Jones AE, Bortz DM, Younger JG: **Dynamics of human complement-mediated killing of *Klebsiella pneumoniae*.** *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2010, **43**(5):585-590.
29. Cortes G, Alvarez D, Saus C, Alberti S: **Role of lung epithelial cells in defense against *Klebsiella pneumoniae pneumonia*.** *Infection and immunity* 2002, **70**(3):1075-1080.
30. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B: **Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins.** *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1985, **28**(2):302-307.
31. Paterson DL, Bonomo RA: **Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update.** *Clinical microbiology reviews* 2005, **18**(4):657-686.
32. Saldana Z, Xicohtencatl-Cortes J, Avelino F, Phillips AD, Kaper JB, Puente JL, Giron JA: **Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli.** *Environmental microbiology* 2009, **11**(4):992-1006.
33. Lin TL, Yang FL, Yang AS, Peng HP, Li TL, Tsai MD, Wu SH, Wang JT: **Amino acid substitutions of MagA in *Klebsiella pneumoniae* affect the biosynthesis of the capsular polysaccharide.** *PloS one* 2012, **7**(10):e46783.
34. Alcántar D, Tinoco JC, Gayosso C, Carlos A, Daza C, Pérez-Orado MC, et al. **Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended-spectrum B-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-1 genes.** *Clin Infect Dis* 2004; **38**:1067-74.
35. González-Vértiz A, Alcántar-Curiel MD, Cuauhtli M, Daza C, Gayosso C, Solache G, et al. **Multiresistant extended-spectrum B-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* causing an outbreak of nosocomial bloodstream infection.** *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001; **22**:725-8.

ANEXO 1
FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

No. de muestra _____
Fecha de aislamiento _____
Fecha de nacimiento ____/____/____ Edad _____ Sexo _____
Patología de base _____

Factores del paciente

1. Unidad donde se encontraba el paciente

- a. UTIP
- b. UCIN
- c. Hospitalización Piso de Pediatría
- d. Admisión continua

2. Uso de catéter central Si [] No []
3. Ventilación mecánica Si [] No [] Duración _____ días
4. Nutrición parenteral Si [] No []
5. Uso de antibióticos previos Si [] No []

¿Cuales?

Desenlace

6. Fallece Si [] No []

Factores de virulencia

7. Formación de biopelícula _____
8. Mucoviscosidad _____
9. Adherencia a células epiteliales _____
10. Evaluación de la fagocitosis _____

Resistencia

BLEE