



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de *Klebsiella*
resistentes a carbapenémicos aisladas de pacientes que
presentaron infecciones asociadas a la atención en salud en tres
hospitales del ISSSTE en la ciudad de México**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

OMAR FERNANDO MENDOZA VÁZQUEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2018.





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Alejandro Camacho Cruz**

VOCAL: **Profesor: Beatriz Ruiz Villafán**

SECRETARIO: **Profesor: Juana Salazar Salinas**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Francisco Javier Díaz García**

2DO SUPLENTE: **Profesor: Tanya Plett Torres**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DEL ISSSTE.

SAN LORENZO 502, SEGUNDO PISO, EDIFICIO "D", COLONIA DEL VALLE, DELEGACIÓN BENITO JUÁREZ.

ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B Juana Salazar Salinas

SUPERVISOR TÉCNICO:

Biól. Gabriel Dámazo Hernandez

SUSTENTANTE (S):

Omar Fernando Mendoza Vázquez

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

° C: Grados Celsius

ATCC: American Typing Culture Collection / Colección Americana de Cultivos Tipo

ATM: Aztreonam

BGN: Bacilos Gram Negativo

BLEE: Betalactamasa de Espectro Extendido

CAZ: Ceftazidima

CAZ-CLA: Ceftazidima / Ácido clavulánico

CDC: Centers For Disease Control and Prevention / Centro de Control y Prevención de Enfermedades

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute / Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

CRE: Enterobacteria Resistente a Carbapenémicos

CRO: Ceftriaxona

CST: Caldo Soya Trypticaseína

CTT: Cefotetan

CTX: Cefotaxima

CTX-CLA: Cefotaxima / Ácido clavulánico

DHP: Dihidropeptidasa Renal

DNA: Deoxyribonucleic Acid / Ácido Desoxirribonucleíco

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

EPC: Enterobacteria Productora de Carbapenemasas

ERT: Ertapenem

EVR: Enterococos Vancomicina Resistente

FDA: Food and Drug Administration / Administración de Alimentos y Medicamentos

FEP: Cefepime

FOX: Cefoxitina

GES: Guyana Extended Spectrum / Espectro Extendido de Guyana

GLASS: Global Antimicrobial Resistance Surveillance System / Sistema Global de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos

I: Intermedio

IAAS: Infecciones Asociadas a la Atención en Salud

IMI: Imipenemase / Imipenemasa

IMP: Imipenem

IMP: Imipenemasa

IMSS: Instituto Mexicano del Seguro Social

ISQ: Infección del Sitio Quirúrgico

ISSSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado

ITS: Infección del Torrente Sanguíneo

KPC: *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase / Carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae*

KRC: *Klebsiella* Resistente a los Carbapenémicos

LPS: Lipopolisacárido

MDR: Multi-Drug Resistance / Multi-Drogo Resistencia

MEM: Meropenem

MIC: Método de Inactivación del Carbapenémico

mm: Milímetro

NDM: New Delhi Metalobetalactamase / Metalobetalactamasa de Nueva Delhi

NOM: Norma Oficial Mexicana

OMP: Outer Membrane Proteins / Proteínas de Membrana Externa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPS: Organización Panamericana de la Salud

OXA: Oxacilinas

P12D: Prueba de los 12 Discos

PBP: Penicilin Binding Protein / Proteínas de Unión a Penicilina

PCR: Polymerase Chain Reaction / Reacción en cadena de la Polimerasa

PPC: Productor Potencial de Carbapenemasas

R: Resistente

RHOVE: Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction / Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

S: Susceptible

SARM: *Staphylococcus aureus* Resistente a Metilina

SINAVE: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

SME: *Serratia marcescens* Enzyme / Enzima de *Serratia marcescens*

SRM: *Staphylococcus* Resistente a Metilina

THM: Test de Hodge Modificado

TSA: Trypticasein Soy Agar/ Agar Soya Trypticaseína

UMAE: Unidad Médica de Alta Especialidad

VIM: Verona Integron-Encoded Metalobetalactamase / Metalobetalactamasa Codificada en Integrón, de Verona

Índice

1.0 RESUMEN	1
2.0 INTRODUCCIÓN	2
3.0 MARCO TEÓRICO	3
3.1 Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS).....	3
3.1.2 Factores que conllevan al desarrollo de IAAS.....	3
3.1.3 IAAS más comunes en México	4
3.1.4 Principales microorganismos causantes de IAAS	5
3.2 Vigilancia epidemiológica de las IAAS.....	7
3.2.1 Vigilancia epidemiológica de las IAAS en México.....	7
3.2.2 Vigilancia de resistencia a antimicrobianos	8
3.3 Características generales del género <i>Klebsiella</i>	9
3.3.1 Factores de patogenicidad en <i>Klebsiella</i>	10
3.3.1.1 Adhesinas	10
3.3.1.2 Polisacárido capsular	10
3.3.1.3 Lipopolisacárido (LPS).....	11
3.4 Antibióticos	12
3.4.1 Betalactámicos.....	12
3.4.2 Carbapenémicos.....	13
3.4.2.1 Imipenem	15
3.4.2.2 Meropenem.....	16
3.4.2.3 Ertapenem	16
3.4.2.4 Doripenem	17
3.4.3 Mecanismo de acción de los carbapenémicos.....	18
3.5.1 Resistencia bacteriana.....	20
3.5.2 Mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias	22
3.5.2.1 Transformación	22
3.5.2.2 Transducción	23
3.5.2.3 Conjugación	24
3.6 Mecanismos de resistencia a los antibióticos en enterobacterias	25
3.6.1 Resistencia a los betalactámicos.....	25
3.6.2 Betalactamasas y su mecanismo de acción	25
3.6.2.1 Clasificación de las betalactamasas.....	26
3.7 Resistencia a los carbapenémicos	27
3.7.1 Disminución o pérdida de la expresión de porinas	28
3.7.2 Bombas de eflujo	28
3.7.3 Producción de carbapenemasas	29

3.7.3.1 Carbapenemasas de clase A	31
3.7.3.1.1 Enzima de <i>Serratia marcescens</i> (SME)	32
3.7.3.1.2 Imipenemasa (IMI).....	32
3.7.3.1.3 Espectro Extendido de Guyana (GES)	32
3.7.3.1.4 Carbapenemasa de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KPC)	33
3.7.3.2 Carbapenemasas de clase B (metalobetalactamasas)	33
3.7.3.2.1 Imipenemasa (IMP).....	33
3.7.3.2.2 Metalobetalactamasa codificada en Integrón, de Verona (VIM)	34
3.7.3.2.3 Betalactamasa de Nueva Delhi (NDM).....	34
3.7.3.3 Carbapenemasas de clase D	34
3.7.3.3.1 Carbapenemasas OXA-48 y tipo OXA-48.....	35
3.8 Métodos de detección de bacterias resistentes a los carbapenémicos	35
3.8.1 Pruebas de difusión en agar	35
3.8.2 Pruebas colorimétricas.....	36
3.8.3 Pruebas moleculares.....	36
4.0 OBJETIVO	37
4.1 Objetivos específicos	37
5.0 HIPÓTESIS.....	37
6.0 METODOLOGÍA	38
6.2 Prueba de los 12 discos.....	39
6.2.1 Controles de calidad para la prueba de 12 discos	39
6.2.2 Esquema para el montaje de la prueba de los 12 discos.....	40
6.3 Test de Hodge Modificado (THM).....	41
6.3.1 Esquema del montaje del Test de Hodge Modificado.....	42
6.4 Método de Inactivación del Carbapenémico (MIC).....	42
6.4.1 Esquema del montaje del MIC.....	43
6.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR)	44
7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	45
7.1 Resultados generales.....	45
7.2 Resultados del equipo automatizado	47
7.3 Prueba de los 12 Discos (P12D)	48
7.3.1 Control de calidad de la Prueba de los 12 Discos	49
7.4 Test de Hodge Modificado (THM).....	53
7.5 Método de Inactivación del Carbapenémico (MIC).....	55

7.5.2 Resultados	56
7.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR)	56
7.7 Análisis global	57
7.7.1 Análisis de casos	61
8.0 CONCLUSIONES	66
9.0 PERSPECTIVAS	67
10.0 BIBLIOGRAFÍA	68
11.0 ANEXOS	73
Anexo A: Resultados	73
Anexo B: Susceptibilidad de las cepas control de calidad.	79
Anexo C: El banco de cepas del Laboratorio de Vigilancia Epidemiológica del ISSSTE	80

1.0 RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo principal la caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos del género *Klebsiella* resistentes a los carbapenémicos, obtenidos de muestras clínicas de pacientes que presentaron Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) en tres hospitales del ISSSTE en la Ciudad de México, durante el periodo comprendido entre los años 2012 y 2015.

Se estudiaron un total de 53 aislamientos, a los cuales se les realizó un panel de identificación y susceptibilidad en el que se obtuvo como resultado el fenotipo: Potencial Productor de Carbapenemasas (PPC), posteriormente se realizaron tres pruebas fenotípicas adicionales, la Prueba de los 12 Discos (P12D), el Test de Hodge Modificado (THM), el Método de Inactivación del Carbapenémico (MIC) y complementario a esto, su genotipo fue determinado por la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR).

La P12D sirvió para confirmar la susceptibilidad a los diferentes carbapenémicos (ertapenem, meropenem, imipenem) mientras que los resultados de las pruebas fenotípicas del THM y el MIC permitieron establecer si las cepas eran productoras de carbapenemasas de acuerdo con lo establecido por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Mediante la evaluación por RT-PCR se identificó que el genotipo predominante en los aislamientos fue *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemasa (KPC, 83%), demostrándose su presencia en la institución desde el año 2012, seguido por New-Delhi-Metalobetalactamasa NDM (1.9%) detectado en una cepa del año 2014. En 7 de las cepas (13.2%) no se definió el mecanismo de resistencia a los carbapenémicos con las pruebas que se utilizaron siendo caracterizadas como *Klebsiella* spp. resistentes a los carbapenémicos (KRC) y solamente una de las cepas (1.9%) resultó susceptible.

Todo este análisis resulta de utilidad para el apoyo al diagnóstico y para la recolección de datos de importancia epidemiológica institucional y nacional.

2.0 INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antibióticos se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial. En el año 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) implementó el plan de acción mundial contra la resistencia a los antimicrobianos, posteriormente en febrero del 2017 la misma organización publicó la lista de microorganismos patógenos prioritarios donde se encuentran en el nivel de prioridad crítica las enterobacterias resistentes a los carbapenémicos y las productoras de betalactamasas de espectro extendido dentro de las cuales se mencionan algunas especies pertenecientes al género *Klebsiella*.

En México en el año 2015 la especie *Klebsiella pneumoniae* ocupaba el tercer lugar como microorganismo causante de IAAS de acuerdo con lo descrito en el reporte anual de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). *K. pneumoniae* se caracteriza por poseer plásmidos que le confieren resistencia a los carbapenémicos (fármacos de última línea utilizados para el tratamiento de IAAS) principalmente mediante la producción de enzimas degradadoras, el cierre/pérdida de porinas o la presencia de bombas de eflujo.

La presencia de los genes involucrados en la producción carbapenemasas se ha descrito a nivel mundial. De acuerdo con el reporte anual 2016-2017 del Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) de la OMS México no aporta datos respecto a la presencia de microorganismos productores de carbapenemasas, limitándose únicamente a proporcionar reportes aislados sin dar el panorama de la situación en la que se encuentra el país con respecto a la resistencia a dichos antibióticos.

Para identificar y evaluar la susceptibilidad a carbapenémicos, en el laboratorio se utilizan diversas técnicas siendo la PCR la más importante, pero su uso se ve limitado por su alto costo. A su vez, se realizan pruebas fenotípicas que aunque son relativamente más sencillas, se requiere de personal altamente capacitado e insumos específicos que no se utilizan con frecuencia dentro de los laboratorios de microbiología. Tomando en cuenta lo anterior debe elegirse la metodología más conveniente para la detección de este tipo de microorganismos con base en la capacidad de los laboratorios.

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS)

Las IAAS son un problema mundial de salud pública debido a su relación con una alta tasa de morbilidad y mortalidad, así mismo son el evento adverso más frecuente durante la prestación de atención sanitaria, son contraídas por el paciente durante su estancia en un hospital, considerando que la infección no estaba presente al momento de su ingreso al nosocomio ni estaba en periodo de incubación. Estas infecciones prolongan la estancia intrahospitalaria, incrementan el costo de atención, y aumentan la resistencia a los antimicrobianos (OMS, 2017), dichas infecciones pueden ser causadas por diversos agentes tales como bacterias, hongos o virus.

En México, en el año 2015 se reportaron 61,969 casos de IAAS, aumentando un 3.7% con respecto al año 2014, y con una tasa de incidencia de 4.7 casos por cada 100 egresos (RHOVE, 2015).

3.1.2 Factores que conllevan al desarrollo de IAAS

Las IAAS son producto de tres clases de factores, los inherentes al hospedero, los ambientales (involucran al medio en el que se encuentra) y los del agente (correspondientes al agente causal de la infección) (RHOVE, 2015) (**figura 1**).

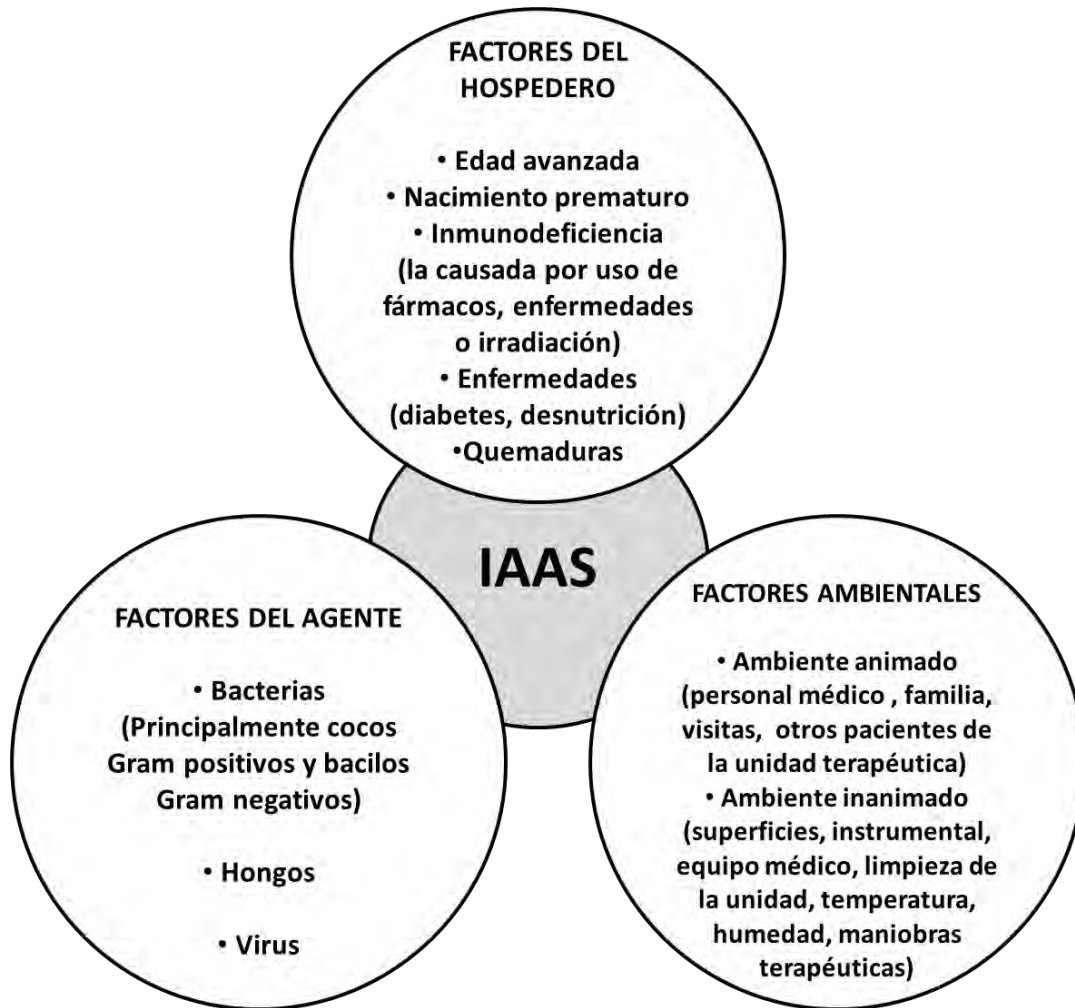


Figura 1. Factores asociados al riesgo de desarrollar IAAS.

3.1.3 IAAS más comunes en México

Existen cuatro tipos principales de IAAS, las infecciones de vías urinarias, infecciones del sitio quirúrgico, infecciones del torrente sanguíneo, y las neumonías asociadas a la ventilación mecánica; en la **tabla 1** se observa que en México durante los años 2014 y 2015 las infecciones del torrente sanguíneo fueron las que se presentaron con mayor frecuencia (RHOVE 2015).

Tabla 1. Número de casos de IAAS reportados en México durante los años 2014, 2015 y su clasificación por tipo de infección (RHOVE, 2015) Modificado.

Tipos de IAAS	IAAS 2014		IAAS 2015	
	Casos	Porcentaje	Casos	Porcentaje
Infecciones del torrente sanguíneo*	13,969	23.4	14,856	24.0
Neumonías**	11,930	20.0	12,851	20.7
Infecciones de vías urinarias	9,463	15.9	9,750	15.7
Infecciones del sitio quirúrgico***	9182	15.4	9,301	15.0

Fuente: Informe anual RHOVE 2015.

*Incluyen: Las confirmadas por laboratorio, relacionadas a catéter, a contaminación de soluciones, secundarias a procedimiento, bacteriemias primarias, secundarias.

**Incluyen: Neumonías asociadas a procedimiento, asociadas a ventilador, con aislamiento microbiológico y las definidas clínicamente.

***Infecciones del sitio quirúrgico: Incluyen superficiales, profundas, de órganos y espacios.

3.1.4 Principales microorganismos causantes de IAAS

A nivel global los microorganismos causantes de IAAS en su mayoría pertenecen al denominado grupo ESKAPE, que por su siglas incluye a *Enterococcus* Vancomicina Resistente (EVR), *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina (SARM), *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y otras especies de enterobacterias como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* etc. (Arias-Flores et al., 2016), y aunque no todos presenten las resistencias mencionadas, los géneros y especies se mantienen como los más relacionados a casos de IAAS. El panorama en México no es muy diferente, de acuerdo con la **tabla 2** y **tabla 3** este grupo de microorganismos encabezan las estadísticas referentes a la producción de IAAS en las instituciones de salud del país.

Tabla 2. Principales agentes etiológicos de IAAS en unidades de la RHOVE en México, en 2015.

Agente etiológico	Casos totales	Porcentaje
<i>Escherichia coli</i>	6,550	18.8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,342	12.4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,310	9.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,459	7.0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2,290	6.6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,191	6.3
<i>Candida albicans</i>	1,830	5.2
<i>Enterococcus faecium</i>	1,311	3.8
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,122	3.2

Fuente: Informe anual RHOVE, 2015. (Modificado)

Tabla 3. Principales agentes etiológicos de IAAS de las unidades médicas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), 2013.

Agente etiológico	Unidades médicas del IMSS		Unidades médicas de segundo nivel		Unidades médicas de alta especialidad (UMAE)	
	Casos	%	Casos	Porcentaje	Casos	%
<i>Escherichia coli</i>	8,192	16.9	6,282	17.9	1,910	14.5
<i>Staphylococcus coagulasa negativo</i>	6,771	14.0	4,899	13.9	1,872	14.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,275	10.9	3,721	10.6	1,554	11.8
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,725	9.8	3,534	10.0	1,191	9.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,122	6.5	2,118	6.0	1,004	7.6
<i>Candida albicans</i>	3,115	6.4	2,499	7.1	616	4.7
<i>Enterobacter cloacae</i>	1,696	3.5	1,158	3.3	538	4.1
<i>Acinetobacter spp.</i>	1,437	3.0	690	2.0	747	5.7

Fuente: Arias-Flores et al. 2016. (Modificado).

La aparición de las mismas especies de microorganismos como causantes de IAAS tanto a nivel global como a nivel nacional, demuestra la importancia de tomar acciones para el control y disminución de casos dentro de los hospitales de la Ciudad de México. Para ello es necesario tener un buen sistema de vigilancia epidemiológica que desarrolle estrategias para frenar el incremento de este tipo de infecciones, impidiendo la diseminación de microorganismos multirresistentes.

3.2 Vigilancia epidemiológica de las IAAS

La vigilancia epidemiológica consta de una serie de acciones necesarias para la toma de decisiones en salud pública, dentro de las cuales se incluyen: Recoger, procesar, analizar, interpretar y difundir datos, de manera sistemática, continua, oportuna y confiable, referentes a la propagación o transmisión de enfermedades, a su vez la manera en que estas puedan prevenirse y controlarse (OPS, 2012).

Para ello se plantean los siguientes objetivos:

- Conformar un comité de prevención y control de IAAS para mantener o disminuir las tasas de las principales IAAS en los hospitales.
- Identificar y controlar tempranamente los brotes implementando estrategias de respuesta rápida en contra de estos.
- Contribuir con estrategias que controlen la aparición y diseminación de la resistencia a los antimicrobianos como lo son el uso racionalizado de los mismos y la supervisión de las buenas prácticas de laboratorio dentro de las instalaciones enfocadas a la salud (OPS,2012).

3.2.1 Vigilancia epidemiológica de las IAAS en México

En México con base en la NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica, corresponde a la Secretaria de Salud gestionar el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) con la ayuda de instituciones del sector público, social y privado, mientras que la vigilancia epidemiológica de las IAAS está a cargo de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), sustentándose en la NOM-045-

SSA2-2005 y mediante la implementación del manual de procedimientos estandarizados para la vigilancia epidemiológica.

3.2.2 Vigilancia de resistencia a antimicrobianos

En 2015 la OMS adoptó el plan mundial contra la resistencia a los antimicrobianos, para el cual utiliza como herramienta principal el Sistema Mundial de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos, GLASS por sus siglas en inglés, cuyo objetivo es enlazar los datos clínicos, epidemiológicos y de laboratorio sobre los microorganismos multirresistentes patógenos que representen un mayor riesgo para la salud mundial (OMS,2017b).

Una parte de la vigilancia de la resistencia bacteriana ocurre dentro de los hospitales, donde es frecuente y prolongado el uso de los antibióticos, acción que genera una presión selectiva que facilita la adquisición de resistencia.

Los datos obtenidos en las identificaciones y susceptibilidades de los microorganismos deben de estar respaldados por las técnicas propuestas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, CLSI por sus siglas en inglés, u otras instituciones similares, donde se proponen metodologías como: la evaluación de la concentración mínima inhibitoria por microdilución en caldo, pruebas de difusión en agar y métodos automatizados, que establecen los criterios necesarios para la selección de los fármacos a emplear en la terapia (RHOVE, 2015).

Con base en los resultados de las pruebas mencionadas anteriormente, se establecieron los marcadores de resistencia de mayor relevancia para la vigilancia epidemiológica nacional (**tabla 4**).

Tabla 4. Mecanismos de resistencia a reportar a la RHOVE de acuerdo con el Gram de la bacteria.

Marcadores de resistencia en Gram negativos	Mecanismos de resistencia en Gram positivos
Betalactamasas de espectro extendido	Resistencia a meticilina
Probable producción de carbapenemasas	Resistencia a vancomicina

Fuente|: Informe anual RHOVE 2015 (Modificado).

3.3 Características generales del género *Klebsiella*

El género *Klebsiella* fue nombrado así en honor al bacteriólogo Edwin Klebs y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, las cepas que se incluyen en este grupo son bacilos Gram negativos (**figura 2**), aerobios facultativos que crecen a temperaturas entre los 30 y 37 °C, inmóviles, capaces de producir una cantidad abundante de cápsula, siendo esta característica la que los diferencia de la mayoría de los demás miembros de esa familia, fermentan la lactosa y otros carbohidratos (**figura 2**). Algunos de los miembros de este género habitan en el suelo o forman parte de la microbiota del tracto respiratorio y gastrointestinal en los humanos. Las especies de *Klebsiella* que se asocian a infecciones en humanos son principalmente *Klebsiella pneumoniae*, posteriormente *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella ozaenae* (Brisse et al., 2006). Como ya se mencionó anteriormente en México *Klebsiella pneumoniae* ocupa el tercer lugar en la lista de agentes causales de IAAS.

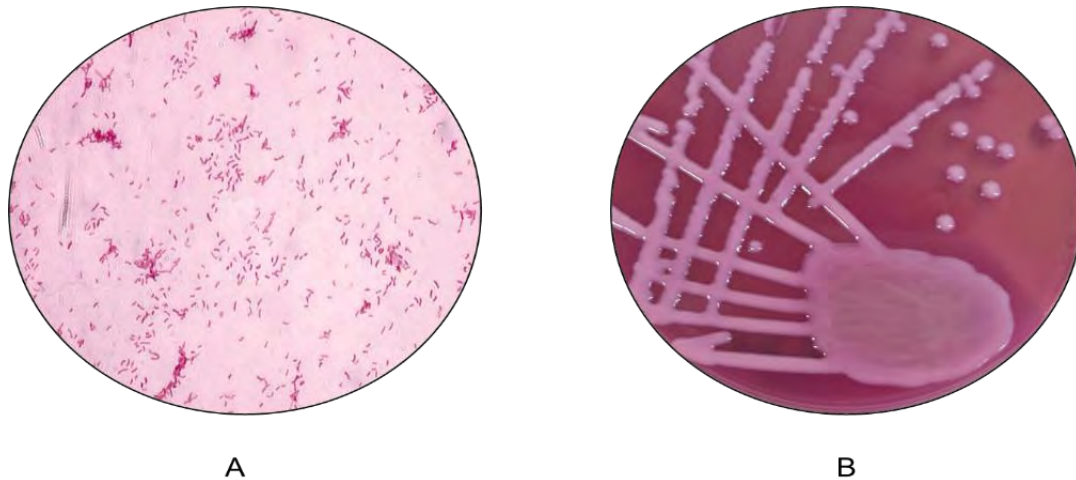


Figura 2. A. Tinción de Gram de un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae*, pueden observarse bacilos Gram negativos. B. Colonias mucoides de *K. pneumoniae* en agar MacConkey.

3.3.1 Factores de patogenicidad en *Klebsiella*

La virulencia de las especies de *Klebsiella* se asocia principalmente a tres factores (**Ver figura 3**):

- a) Adhesinas
- b) Polisacárido capsular (antígeno K)
- c) Lipopolisacárido (LPS)

3.3.1.1 Adhesinas

La adhesión a las mucosas y a los tejidos es el paso fundamental para que se logre llevar a cabo la colonización-infección del hospedero. En las especies de *Klebsiella* y otras enterobacterias se lleva a cabo gracias a la ayuda de las fimbrias, que están ancladas a la membrana celular externa y sirven de soporte de las adhesinas facilitando la adhesión de la bacteria a las superficies celulares (Molina-López, sf).

3.3.1.2 Polisacárido capsular

La cápsula es un elemento importante en la virulencia asociada a *Klebsiella*, gracias a ella estos microorganismos son capaces de evitar la fagocitosis y resistir la actividad bactericida de algunas sustancias presentes en el suero sanguíneo, dicha estructura está

compuesta por cadenas de polisacáridos muy complejas (antígenos K). Se han reportado 77 serotipos capsulares en esta especie (Podschun & Ullmann, 1998).

3.3.1.3 Lipopolisacárido (LPS)

El lipopolisacárido es una molécula compuesta por lípido A, un núcleo de polisacárido y una cadena lateral denominada antígeno O, cuya función es proteger a las células bacterianas de la actividad del complemento, se han relacionado a estas moléculas con la necrosis que se genera en los tejidos infectados por dichas bacterias (Brooks et al., 2005).

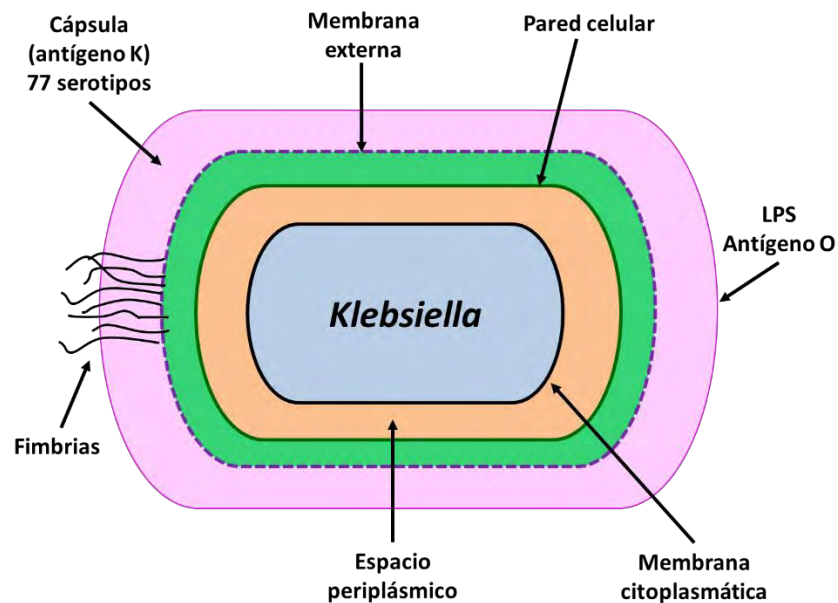


Figura 3. Algunas estructuras importantes presentes del género *Klebsiella*.

3.3.2 *Klebsiella* y la resistencia a los antibióticos

Klebsiella pneumoniae figura como el patógeno de mayor importancia clínica del género, esto se debe a la aparición y diseminación de cepas resistentes a múltiples antibióticos. Estas suelen portar una amplia variedad de genes que limitan las opciones terapéuticas disponibles. La diseminación de la resistencia en *Klebsiella* spp. se asocia a la presencia de elementos genéticos móviles como los plásmidos (Moradigaravand et al., 2017).

3.4 Antibióticos


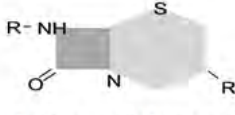
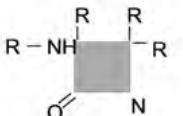
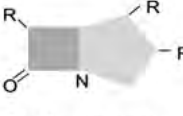
Son moléculas que tienen efectos selectivos y específicos sobre las bacterias, como actividad ante las enzimas necesarias para la síntesis de la pared celular, la síntesis de nucleótidos, la replicación del DNA, además de acción sobre el ribosoma y la membrana celular. La adición de estas sustancias en un medio con dichos microorganismos puede tener como consecuencia la inhibición del crecimiento sin eliminar a las bacterias en su totalidad (efecto bacteriostático), o la muerte de las mismas (efecto bactericida) (Calvo & Martínez-Martínez 2009).

3.4.1 Betalactámicos

Los betalactámicos son fármacos que interfieren en la síntesis de peptidoglucano de la pared celular; a nivel de la reacción de transpeptidación; representan al grupo de antibióticos más extenso y al que se utiliza con mayor frecuencia en la clínica (Marín & Guidol, 2002). La eficiencia de este grupo depende de respetar los intervalos de tiempo de dosificación, ya que actúan sobre células en proceso de división. Poseen un espectro de actividad que abarca desde cocos Gram positivos, exceptuando a los *Staphylococcus* Resistentes a Meticilina (SRM), hasta bacilos Gram negativos (BGN) tanto fermentadores como no fermentadores, excluyendo a aquellos que poseen algún mecanismo de resistencia contra betalactámicos (Gómez et al., 2015).

Estructuralmente estos antibióticos comparten un anillo de lactama (amida cíclica) característico, el cual se compone de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno, denominado betalactama porque el carbono β se une al átomo de nitrógeno en relación β al carbonilo, de acuerdo a los radicales que se le adicionen se puede mejorar su acción antimicrobiana (espectro) y farmacocinética (Gómez et al., 2015), pudiéndolos clasificar en los siguientes grupos: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (tabla 5).

Tabla 5. Estructura base de los diferentes grupos de antibióticos betalactámicos.

GRUPO DE BETALACTÁMICOS	ESTRUCTURA BASE	CONFORMACIÓN DE LA ESTRUCTURA BASE
Penicilinas	 <p>Ácido 6-aminopenicilánico</p>	Anillo betalactámico + Anillo tiazolidínico
Cefalosporinas	 <p>Ácido 7 α-cefalosporínico</p>	Anillo betalactámico + Anillo cefalosporínico
Monobactámicos	 <p>Monobactamo</p>	Adición de radicales al anillo betalactámico
Carbapenémicos	 <p>Carbapenem</p>	Anillo betalactámico + Anillo pirrolínico

Fuente: Suarez & Guidol (2009).

3.4.2 Carbapenémicos

En 1976 se descubrió la tienamicina, un compuesto de origen natural producido por *Streptomyces catleya*, el cual presentaba similitudes con los betalactámicos pero cuya inestabilidad química no favorecía su uso terapéutico, razón por la que se comenzaron a desarrollar nuevos derivados denominados como carbapenémicos, que posteriormente serían considerados como los fármacos de última línea o de último recurso en el tratamiento de infecciones intraabdominales severas y otros tipos de infecciones de origen nosocomial (Papp-Wallace et al. 2011), su uso en estas situaciones se atribuye a que presentan diversas características como:

- Amplio espectro de actividad que incluye tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas.
- Penetran fácilmente la membrana externa de las bacterias Gram negativas.
- Son estables a la hidrólisis por betalactamasas plasmídicas o cromosómicas.
- Alta afinidad a las proteínas de unión a penicilina (PBP-2, PBP-3, PBP-4 y PBP-1b).

Como puede verse en la **tabla 5** este grupo de antibióticos difiere de las penicilinas y las cefalosporinas por la sustitución del átomo de azufre en la posición 1 por un átomo de carbono, están formados por la condensación de un anillo betalactámico y un anillo pirrolínico con un enlace insaturado entre la posición 2 y 3, todos sus derivados tienen un grupo hidroxietilo en la posición 6 con configuración *trans* el cual le otorga protección al anillo betalactámico contra la acción de enzimas que degradan este tipo de antibióticos (betalactamasas) y en la posición 3 un grupo carboxilo, que ayuda a la activación del anillo betalactámico (Carrascoso, 2016) **ver figura 4**.

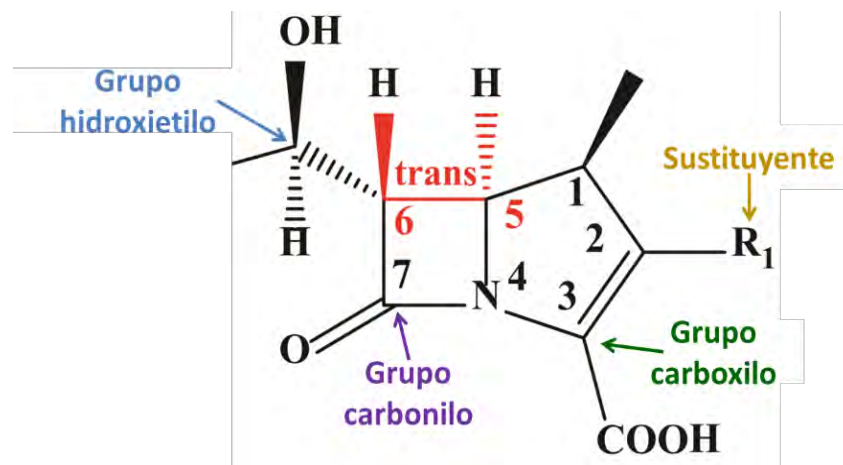


Figura 4. Estructura base de un antibiótico del grupo de los carbapenémicos, fuente: Papp-Wallace et al., 2011.

El grupo de los carbapenémicos incluye al imipenem, ertapenem, meropenem y doripenem, y puede clasificarse en dos grupos de acuerdo con la actividad que presenten en contra de *Pseudomonas aeruginosa* (**tabla 6**).

Tabla 6. Clasificación de los carbapenémicos con base en su actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Carbapenémico	Activo contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ertapenem	No
Imipenem	Si
Meropenem	
Doripenem	

3.4.2.1 Imipenem

Fue el primer fármaco de este grupo en ser descubierto y aprobado para el uso clínico (1985), debido a que como su predecesor, la tienamicina, mostró una excelente afinidad por las PBP's pero con mayor estabilidad. Estructuralmente (**figura 5**) difiere de los demás carbapenémicos al carecer de un metilo en la posición 1-β, por lo que es susceptible a la degradación por la enzima dihidropeptidasa renal (DHP) y requiere de su administración conjunta con cilastatina, un inhibidor de la DHP (Papp-Wallace et al., 2011). Presenta el menor peso molecular de todos los carbapenémicos y posee una estructura compacta, lo que facilita su entrada a través de las porinas de los Gram negativos e incluso de microorganismos Gram positivos. Actualmente sigue siendo muy empleado en la clínica pese a sus efectos secundarios.

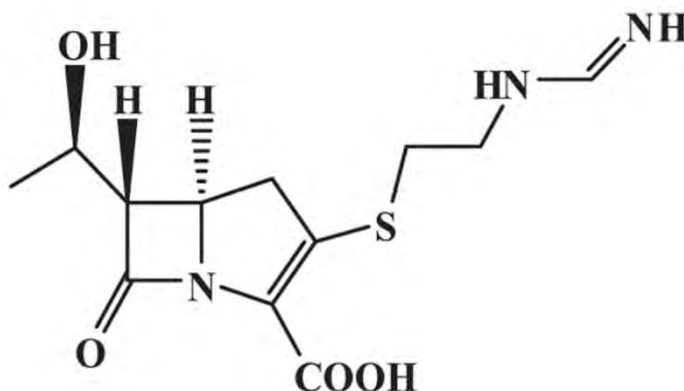


Figura 5. Estructura química del imipenem, fuente: Papp-Wallace et al., 2011.

3.4.2.2 Meropenem

Aceptado por la FDA (Food and Drug Administration) en 1996, fue el primer 1-beta-metil carbapenem sintético, por lo que a diferencia del imipenem presenta estabilidad ante la acción de la DHP (Kattan et al., 2008), su cadena lateral está compuesta por un grupo dimetil-carbamoil-pirrolidin-tio (**figura 6**) que ayuda a la molécula a tener un mayor espectro ante microorganismos Gram negativos pero disminuye su actividad contra microorganismos Gram positivos, clínicamente presenta menos efectos secundarios que el imipenem (Fresnadillo, et al., 2010).

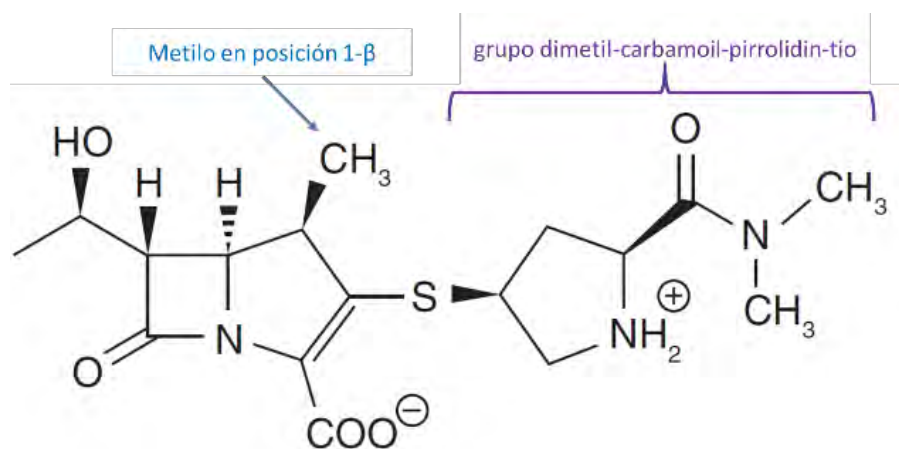


Figura 6. Estructura química del meropenem, fuente: Papp-Wallace et al., 2011.

3.4.2.3 Ertapenem

En el 2001 la unión europea autorizó el uso clínico del ertapenem que es un 1-beta-metil carbapenem sintético con estabilidad ante la dihidropeptidasa renal, por lo cual no requiere de administración conjunta de cilastatina, en contraste con imipenem posee un grupo metilo en el carbono 1, y un grupo carboxifenil amino-carbomoilpirrolidin-tio, similar al de meropenem, denominado grupo benzoato (**figura 7**) que facilita su unión a proteínas plasmáticas pero a su vez favorece su eliminación por bombas de eflujo presentes en ciertos microorganismos, esta fracción también le ayuda a alargar su vida media. Ertapenem puede resistir moderadamente la actividad de enzimas de tipo Amp-C y Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE), manteniendo su actividad en contra

de bacterias Gram negativas productoras de betalactamasas de alta potencia diferentes a las carbapenemasas (Morales, 2003).

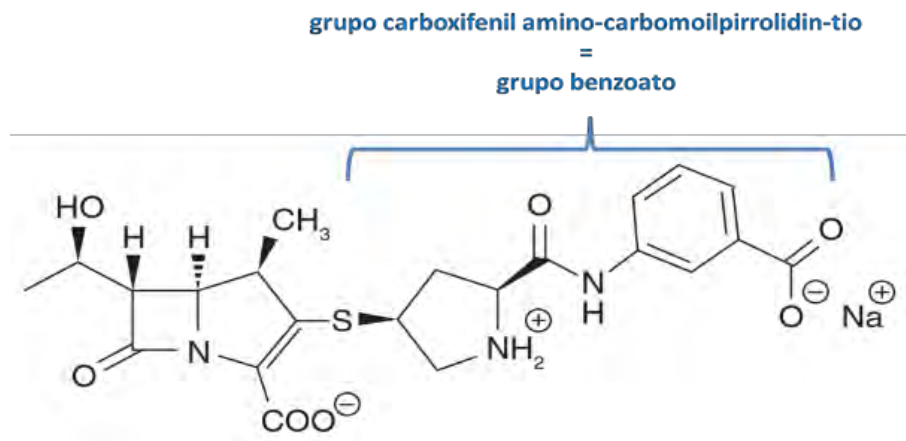


Figura 7. Estructura química del ertapenem, fuente: Gobernado & Acuña, 2007.

3.4.2.4 Doripenem

Es el último de los 1-beta-metil-carbapenem aceptado por la FDA para su uso clínico (2009), como los demás carbapenémicos tiene una buena estabilidad en presencia de betalactamasas, a su vez como meropenem y ertapenem es activo frente a la DPH. Gracias a su cadena lateral que contiene un grupo sulfamoiil-aminometil-pirrolidin-tio (Fresnadillo et al., 2010), se le atribuye una mayor actividad en contra de los BGN no fermentadores como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*, además de una buena actividad contra cocos Gram positivos similar a la del imipenem (Fritsche et al., 2005) ver **figura 8**.

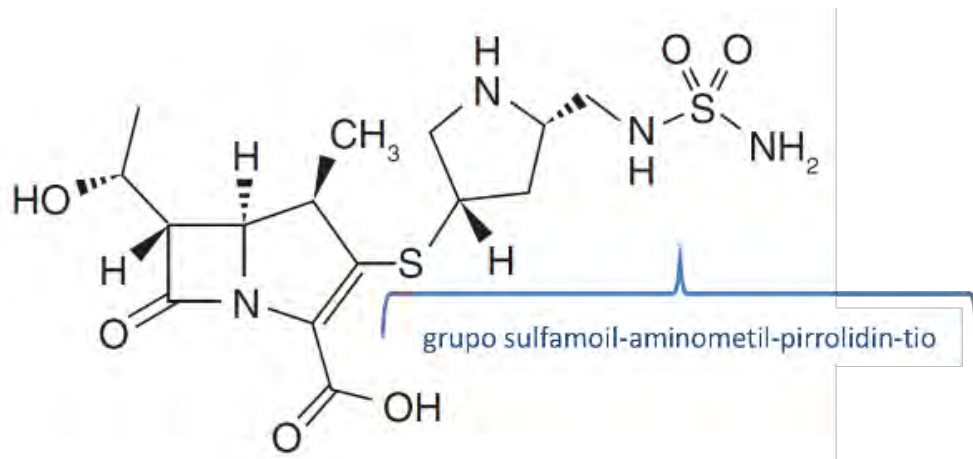
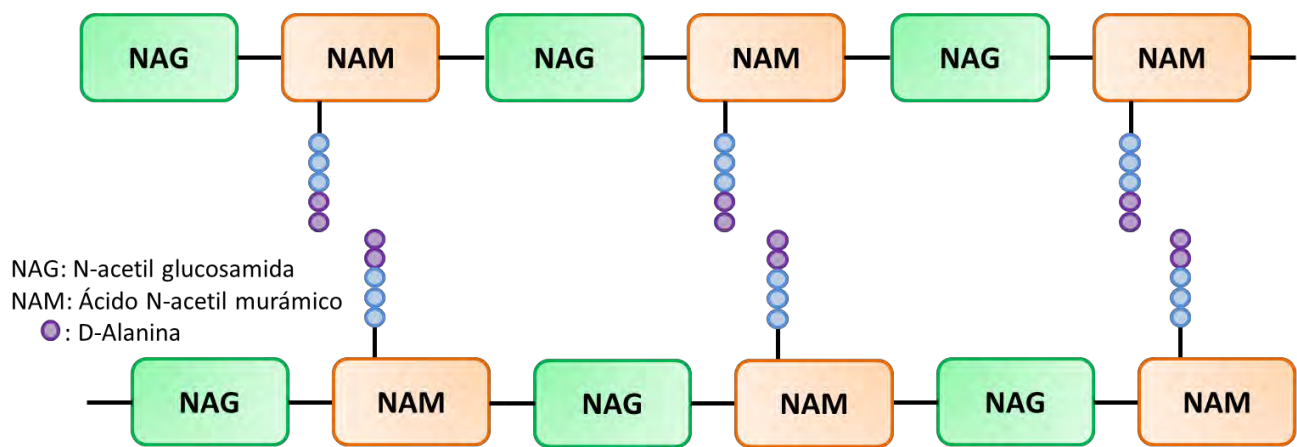


Figura 8. Estructura química del doripenem, fuente Fresnadillo et al., 2010.

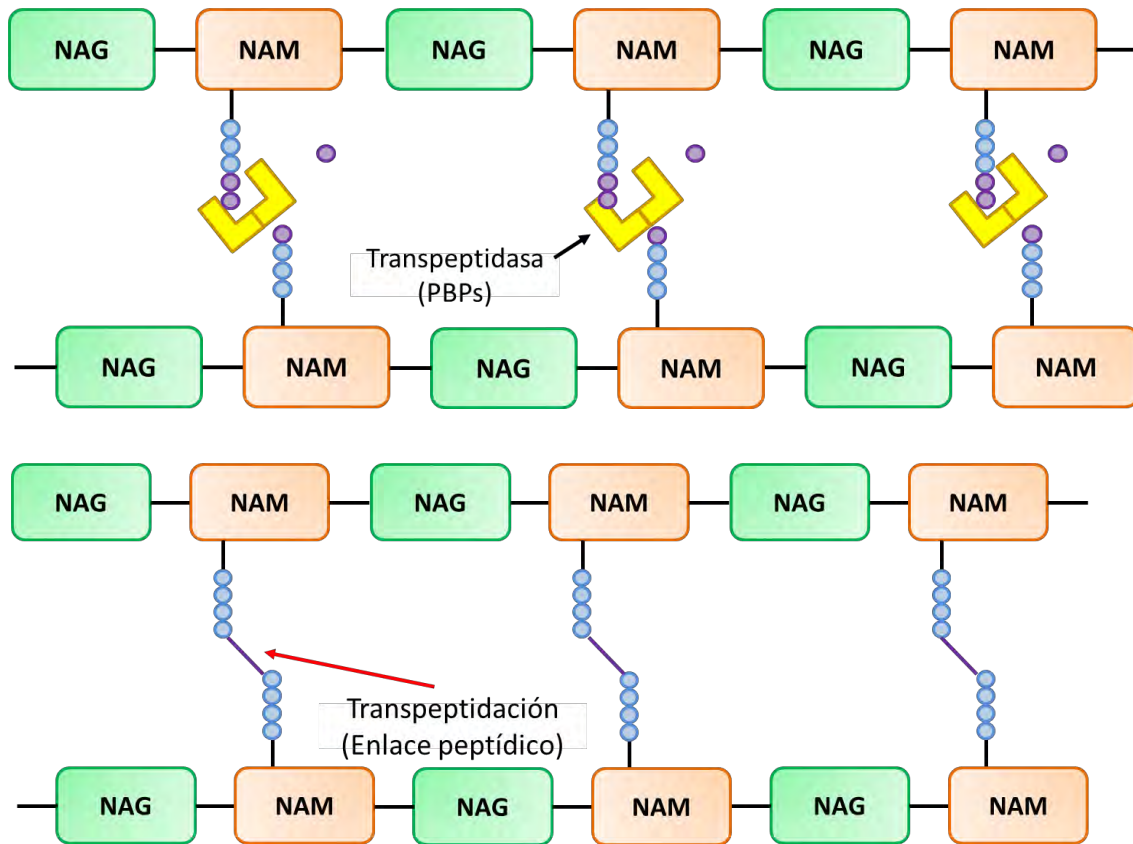
3.4.3 Mecanismo de acción de los carbapenémicos

Al ser parte de la familia de los betalactámicos, los carbapenémicos tienen como principal mecanismo de acción la inhibición de la síntesis de la pared celular, particularmente cuando ocurre la transpeptidación, estas moléculas se unen a las proteínas de unión a penicilina PBP's principalmente las de mayor peso molecular (PBP-1a, PBP-1b, PBP-2, PBP-3 y PBP-4) impidiendo un adecuado ensamblaje de la pared celular, lo que tiene como consecuencia la lisis de la bacteria (**figura 9**) (Fresnadillo et al., 2010).

1) Las cadenas de peptidoglucano comienzan a agruparse para formar la pared celular.



- 2) La transpeptidasa (PBP) ensambla las cadenas peptídicas del peptidoglucano mediante un enlace peptídico.



- 3) El carbapenem se une a la transpeptidasa (PBPs de alto peso molecular) impidiendo que esta lleve a cabo la transpeptidación, teniendo como consecuencia la lisis de la bacteria.

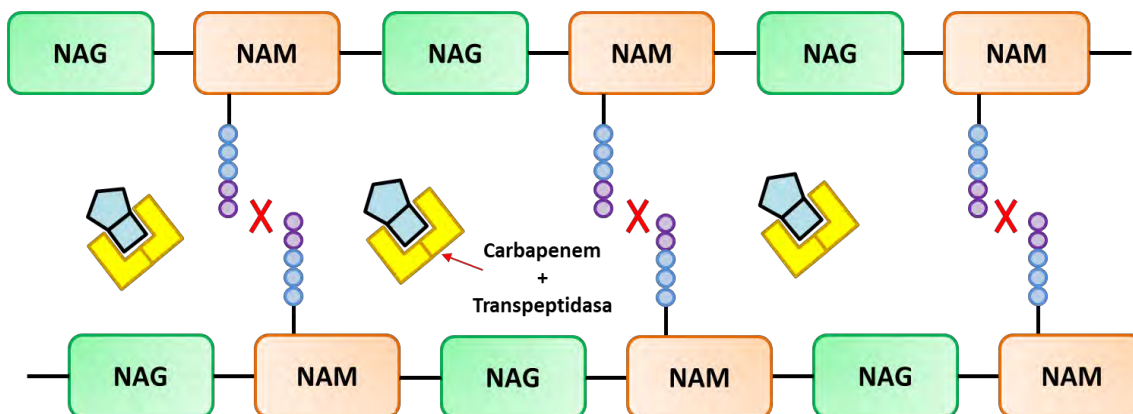


Figura 9. Inhibición de la síntesis de la pared celular por la actividad de los carbapenémicos.

3.5 Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia a los antimicrobianos es un suceso que se produce cuando los microorganismos, sean bacterias, hongos, virus y parásitos, se ven obligados a realizar cambios a causa de la presión selectiva ejercida por los antibióticos, antifúngicos, antivíricos, y antihelmínticos en el medio donde se desarrollan, teniendo como consecuencia que estos pierdan sus efectos. De esta manera las infecciones que generan los microorganismos multirresistentes aumentan su duración, elevan el riesgo de propagación e incrementan la mortalidad de las personas que se ven afectadas por ellas.

Los microorganismos adquieren resistencia naturalmente en un determinado tiempo, sin embargo, el hombre ha incrementado la velocidad con la que se presenta este fenómeno, como consecuencia del uso indebido de los fármacos no solamente a nivel hospitalario, también a nivel comunitario e incluso ganadero, por lo cual encontrar microorganismos multirresistentes en lugares donde antes parecía difícil resulta sencillo en estos tiempos (OMS, 2017b).

3.5.1 Resistencia bacteriana

Naturalmente, la resistencia a los antibióticos puede darse de dos maneras: la primera es la resistencia intrínseca que está presente de manera conservada entre las mismas especies o géneros de microorganismos. Un ejemplo sería *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas por naturaleza, con las cuales puede evitar el efecto de fármacos como la ampicilina, así mismo los bacilos Gram negativos aerobios que al no tener el sitio de acción para la clindamicina son resistentes a esta por naturaleza (Pérez-Cano & Contreras, 2013). De la misma manera la falta de permeabilidad de la membrana externa en géneros como *Pseudomonas* y *Acinetobacter* y la presencia de bombas de eflujo en diversas enterobacterias confieren a estos microorganismos resistencia a cierto tipo de fármacos, la propagación de este tipo de resistencia se da de manera vertical únicamente (**figura 10**).

La segunda manera es mediante la transferencia genética horizontal mediante plásmidos, transposones, integrones o asimilación de DNA desnudo, ya sea cromosomal o extracromosomal, mediante el uso de ciertos mecanismos destinados a la asimilación de material genético entre bacterias (Fernández & Hancock, 2012).

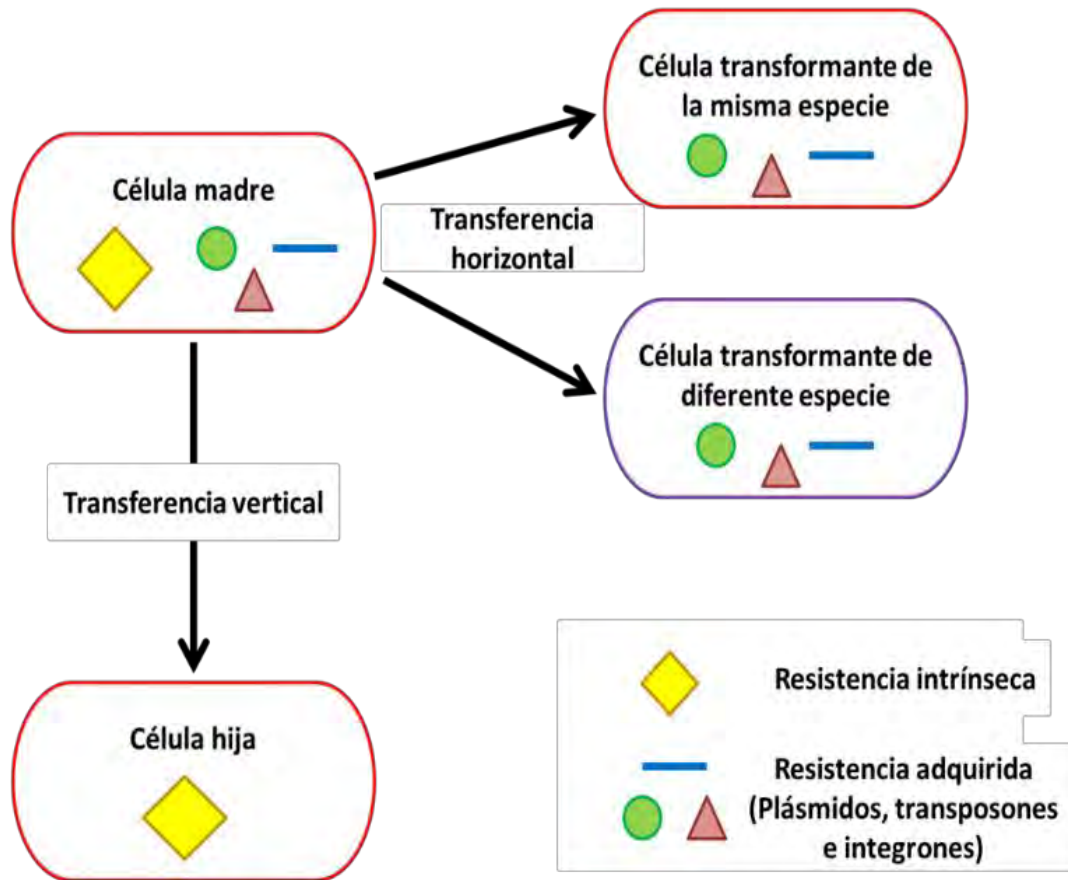


Figura 10. Esquema de la diseminación de la resistencia a antibióticos entre bacterias.

Ambos tipos de resistencia son relevantes, pero este estudio se enfoca en la resistencia adquirida, ya que su impacto es mayor en el campo clínico, debido a la facilidad con la que se propaga y a la dificultad que genera para encontrar una terapia adecuada cuando un paciente sufre una infección relacionada con microorganismos que hayan adquirido dicha resistencia.

3.5.2 Mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias

En las bacterias, la manera en la que se lleva a cabo la recombinación del material genético entre individuos de una o diferentes especies es por medio de una serie de mecanismos independientes de la división celular, denominados: transformación, transducción, conjugación, los cuales ayudan a estos microorganismos a adquirir características que antes no poseían (factores de virulencia, resistencia a antibióticos, resistencia a metales pesados, producción de metabolitos) y a sobrevivir en el ambiente en que se desarrollan (Betancor et al., 2006).

3.5.2.1 Transformación

La transformación se puede definir como el proceso por el cual una bacteria competente incorpora DNA exógeno del medio en el que se encuentra (proveniente de una bacteria donadora) a su material genético (**ver figura 10**), para posteriormente expresar una característica genotípica o fenotípica que antes no poseía (Baron, 1996). Este proceso no ocurre con facilidad en la naturaleza, ya que solo algunos géneros o especies bacterianos son capaces de realizarlo como por ejemplo (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus*, *Neisseria* y *Bacillus*) (Betancor et al., 2006).

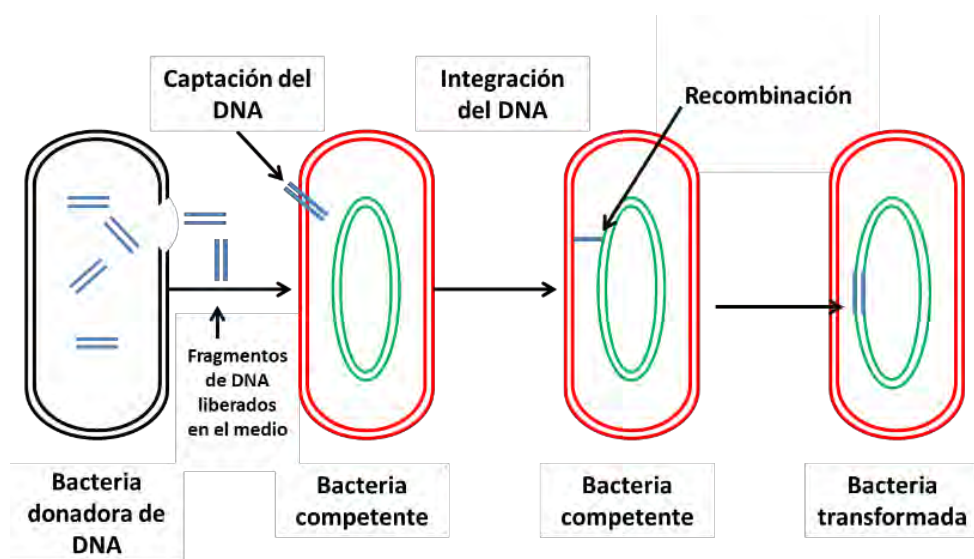


Figura 10. Esquema de la transformación bacteriana.

3.5.2.2 Transducción

Se denomina transducción al proceso de transferencia de material genético en el cual el DNA de la célula bacteriana donadora se transporta por medio de un bacteriófago (virus) y se incorpora a la célula receptora como consecuencia de la infección por el virus (Brooks et al., 2005). **Ver figura 11.**

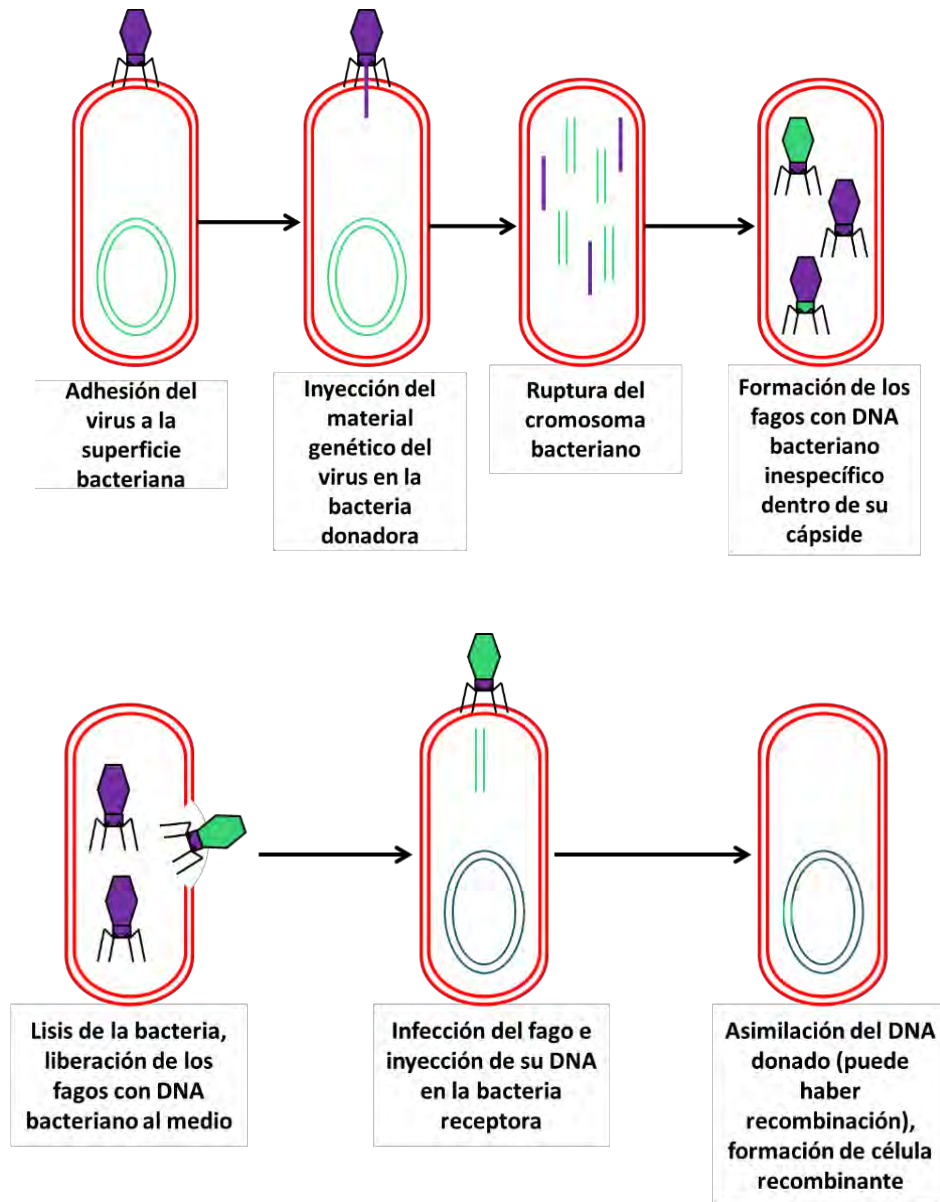


Figura 11. Esquema de la transducción generalizada.

3.5.2.3 Conjugación

La conjugación es la transferencia de genes mediada por estructuras tipo pili codificadas en el factor F, que puede encontrarse en plásmidos dentro del genoma. En los microorganismos Gram negativos existe un plásmido que porta los genes codificantes de los pili sexuales, extensiones de la célula donadora con las cuales las bacterias logran tener contacto directo entre ellas (Tortora, 2007). Este proceso está descrito detalladamente para *E. coli* donde se denominó al plásmido que contiene los genes de los pili sexuales como plásmido F´.

La información que puede contener un plásmido no se limita únicamente a la transferencia de genes relacionados con la conjugación como el plásmido F´, también contienen otro tipo de genes que favorecen la supervivencia de la bacteria como se muestra en la **tabla 7**, siendo de relevancia clínica los involucrados en la resistencia a antibióticos.

Tabla 7. Tipos de plásmidos y los microorganismos donde pueden encontrarse.

Tipo de plásmido	Microorganismo portador
Plásmidos de resistencia a antibióticos (R)	Enterobacterias <i>Staphylococcus</i> <i>Pseudomonas</i>
Plásmidos de resistencia a metales pesados (Hg, Cd, Ni, Cu, Pb)	Enterobacterias <i>Staphylococcus</i> <i>Pseudomonas</i>
Plásmidos conjugativos	<i>E. coli</i>
Plásmidos para la producción de bacteriocinas y antibióticos	Enterobacterias <i>Clostridium</i> <i>Streptomyces</i>
Plásmidos metabólicos <ul style="list-style-type: none">• Metabolismo de carbohidratos (lactosa y sacarosa)• Degradación de hidrocarburos	Enterobacterias <i>Pseudomonas</i>
Plásmidos de virulencia o interacción con el hospedero (Enterotoxinas, neurotoxinas y hemolisinas)	<i>E. coli</i> <i>C. tetani</i>

Fuente: modificado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/geneticabacteriana_9091.pdf.

3.6 Mecanismos de resistencia a los antibióticos en enterobacterias

Las enterobacterias poseen una maquinaria tanto genética como metabólica para sobrevivir al efecto que ejercen los antibióticos, en la mayoría de estos microorganismos la resistencia a los mismos se lleva a cabo de tres maneras (Vignoli & Seija, 2008):

- Por la inactivación del antibiótico mediante la producción de enzimas.
- Mediante cambios en el sitio blanco del antibiótico.
- Realizando modificaciones en la permeabilidad celular de las bacterias.

3.6.1 Resistencia a los betalactámicos

El principal mecanismo de resistencia a los betalactámicos es la producción de enzimas que hidrolizan dichos fármacos, estas enzimas se denominan betalactamasas, a su vez se encuentran las modificaciones del sitio blanco del antibiótico, los cambios en la permeabilidad de la membrana debidos a la menor expresión o a la pérdida de las porinas (proteínas encargadas de regular la entrada de moléculas a la células bacterianas), o la sobreexpresión de genes que codifican para las bombas de eflujo encargadas de sacar del interior de la célula ciertas moléculas (Suarez & Guidol 2009).

3.6.2 Betalactamasas y su mecanismo de acción

Las betalactamasas son enzimas que rompen el enlace amida presente en el anillo betalactámico inactivándolo (**figura 12**). Los genes que codifican para estas enzimas pueden encontrarse tanto en los cromosomas bacterianos como en plásmidos, siendo los últimos de mayor importancia clínica dada la fácil propagación de este tipo de elementos de resistencia. La afinidad que tienen hacia los betalactámicos es mayor que las del antibiótico con las PBP, teniendo como consecuencia que el espectro de las betalactamasas abarque desde las penicilinas, las cefalosporinas hasta los carbapenémicos en algunos casos (Solórzano, 2004).

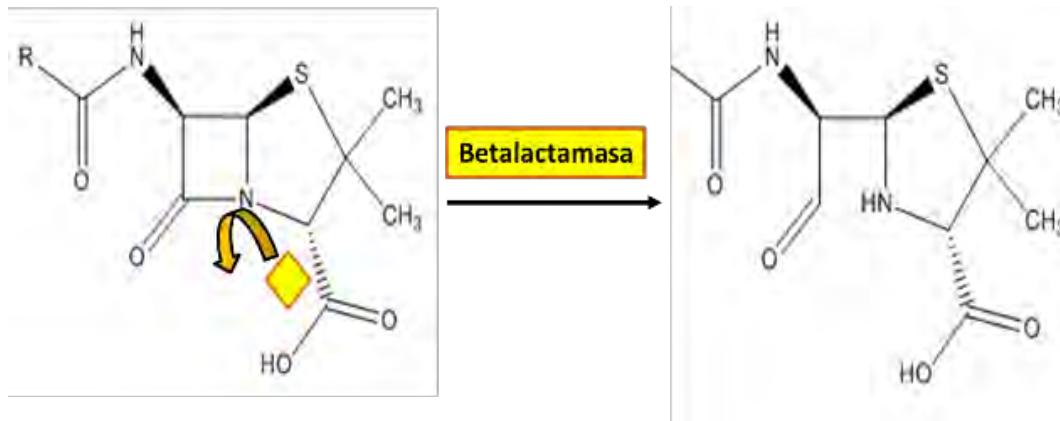


Figura 12. Mecanismo de acción de las betalactamasas (e.g. en las cefalosporinas).

3.6.2.1 Clasificación de las betalactamasas

Están clasificadas de dos maneras, la primera, la clasificación molecular de Ambler que depende del porcentaje de identidad de las proteínas que las constituyen, y la segunda conforme a su funcionalidad de Bush-Jacoby y Medeiros (Shaikh et al., 2014).

La clasificación de Ambler se compone de cuatro clases (A,B,C,D) como lo muestra la (**figura 13**), las pertenecientes a los grupos A,C,D se nombran serin-betalactamasas debido a que utilizan a este aminoácido para llevar a cabo la hidrólisis del antibiótico, y las pertenecientes al grupo B se conocen como metalo-betalactamasas ya que su función depende de la presencia de un catión divalente metálico usualmente Zinc²⁺ (Bush y Jacoby 2010).

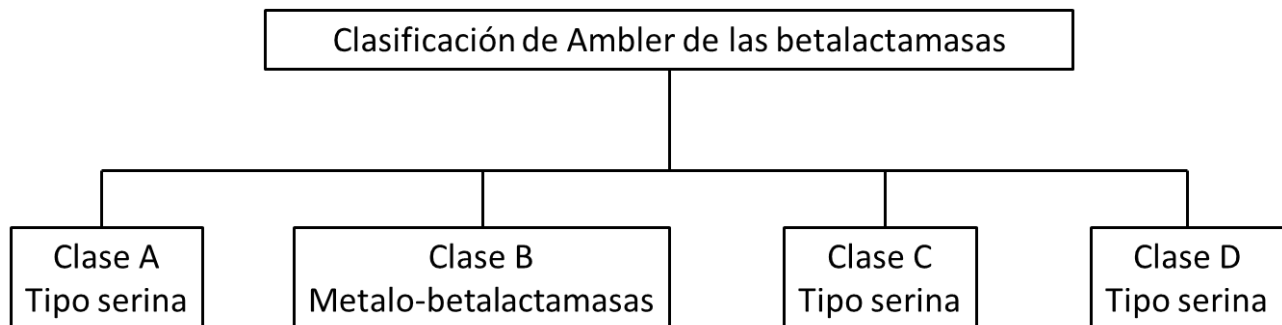


Figura 13. Clasificación de Ambler para las betalactamasas

Por otra parte, la clasificación funcional de Bush-Jacoby y Medeiros considera que las betalactamasas están divididas en tres grupos (1,2,3) con base en los sustratos y los perfiles inhibitorios de estas, actualmente con la aplicación de métodos moleculares se ha ampliado esta clasificación con nuevos subgrupos que hacen más específica esta clasificación los cuales van de la letra “a” hasta la “f” (Bush & Jacoby, 2010) **ver tabla 8.**

Tabla 8. Ejemplos de la clasificación de Bush-Jacoby para las betalactamasas.

Grupo	Subgrupo	Observaciones
1	A	Espectro que abarca las cefalosporinas, benzilpenicilinas, y la cefamicina.
	E	Espectro que abarca las cefalosporinas, mejor hidrólisis de ceftazidima
2	B	Penicilinas, cefalosporinas de primeras generaciones
	Be	Cefalosporinas de amplio espectro, monobactams
3	A	Hidrólisis de amplio espectro en los betalactámicos exceptuando a los monobactams
	b	Hidrólisis de amplio espectro preferentemente a los carbapenémicos

3.7 Resistencia a los carbapenémicos

Cuando se emplean los carbapenémicos, las enterobacterias en su mayoría suelen expresar 3 mecanismos de resistencia ya mencionados anteriormente y que se explican a continuación (Meletis, 2016). **Figura 14.**

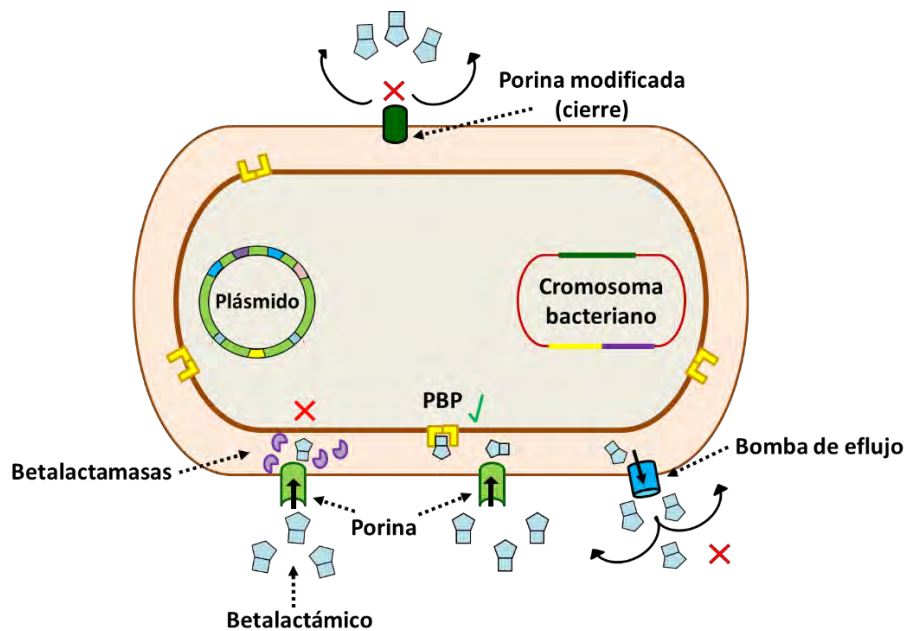


Figura 14. Mecanismos generales de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias.

3.7.1 Disminución o pérdida de la expresión de porinas

Las porinas proveen una vía de entrada para los antibióticos de tamaño pequeño a través de la membrana externa de las bacterias, dado esto, cualquier cambio en el tamaño, forma o rango de entrada de estas proteínas puede conllevar a la resistencia a antibióticos. Se han descrito mecanismos de alteración de las proteínas de membrana externa en diversas especies de bacterias como: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *E. aerogenes* y *K. pneumoniae*.

Existen dos mecanismos principales de resistencia a antibióticos asociados con las porinas (Delcour, 2009). **Figura 14.**

- 1) Alteraciones de las proteínas de membrana, incluyendo la pérdida o la disminución de la cantidad de porinas.
- 2) Alteración de la función debida a mutaciones específicas que reducen la permeabilidad.

Ambos mecanismos son dependientes de la expresión de diversos genes.

3.7.2 Bombas de eflujo

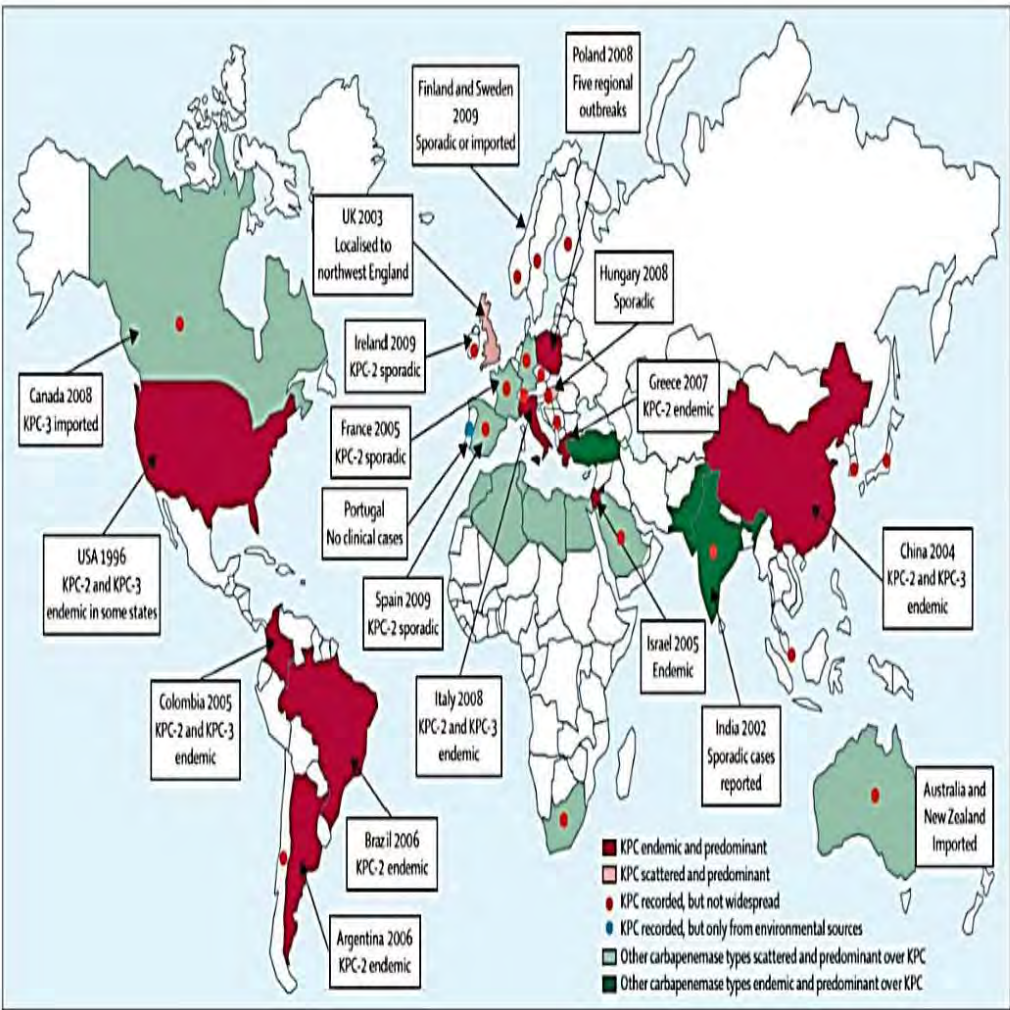
Las bombas de eflujo son transportadores situados en la membrana externa que ayudan a eliminar sustancias tóxicas que han ingresado a la célula bacteriana, están conformadas por proteínas que pueden estar presentes tanto en Gram positivos y negativos. Estas bombas pueden ser selectivas o funcionar para diversos sustratos específicos incluyendo los antibióticos, por lo cual la presencia de algunas de ellas se asocia a la multirresistencia (bombas tipo MDR). Este tipo de resistencia es propia de algunas especies de bacterias como (*S. aureus*, *H. influenzae* y *P. aeruginosa*), (Marchetti, et al., 2011).

3.7.3 Producción de carbapenemasas

Las carbapenemasas son enzimas capaces de hidrolizar a los carbapenémicos, pertenecen a la familia de las betalactamasas, sin embargo dentro de las betalactamasas de clase C no existe ninguna enzima con actividad de carbapenemasa (Diene & Rolain 2014).

La aparición de cepas productoras de carbapenemasas se ha incrementado a nivel global, y dado que algunos países no cuentan con un buen sistema de vigilancia epidemiológica, no se logra visualizar en tiempo y forma la aparición de estas cepas.

Figura 15.



- KPC endémica y predominante
- KPC diseminada y predominante
- KPC reportada, pero no diseminada
- KPC reportada, únicamente en fuentes ambientales
- Otros tipos de carbapenemasas diseminados y predominantes sobre KPC
- Otros tipos de carbapenemasas endémicos y predominantes sobre KPC

Figura 15. Distribución de carbapenemasas a nivel global, fuente: The Lancet France, 2013.

3.7.3.1 Carbapenemasas de clase A

Las carbapenemasas de clase A son denominadas carbapenemasas de tipo serina, ya que poseen un residuo de serina en la posición 70 de su sitio activo, el cual está altamente conservado en diversas especies de microorganismos (Walther-Rasmussen & Høiby, 2007). La actividad de estas enzimas en su mayoría se ve inhibida por el ácido clavulánico y el ácido borónico (**ver tabla 8**). Por otra parte, la ubicación de los genes que codifican para estas enzimas puede ser tanto cromosómica como plasmídica siendo las de mayor importancia clínicas las últimas dada la facilidad de transmisión de elementos genéticos, las carbapenemasas más importantes de esta clase son SME, IMI, GES y KPC (Dahiya et al. 2015).

Tabla 8. Resumen de las principales carbapenemasas y su espectro hidrolítico en las enterobacterias.

Clase Ambler	Principales carbapenemasas	PERFILES DE HIDRÓLISIS EN ENTEROBACTERIAS					Inhibidas por
		Penicilinas	Cefalosporinas de 1ra y 2da generación	Cefalosporinas de 3ra y 4ta generación	Monobactams	Carbapenémicos	
A	KPC, GES, SME, IMI	+	+	+	+	+	Ácido borónico
B	NDM, VIM, IMP	+	+	+	-	+	EDTA
C	OXA-48 Y "TIPO OXA-48"	+	+	-	±	+	No se ha descrito

Fuente: Aguirre-Quiñonero & Martínez-Martínez, 2017 (modificado).

3.7.3.1.1 Enzima de *Serratia marcescens* (SME)

Fue la primera enzima con actividad de carbapenemasa descubierta, detectada en dos aislamientos de *Serratia marcescens* de pacientes en Inglaterra en 1982 (Queenan et al. 2006).

El gen (*bla_{SME}*) que codifica para esta enzima se encuentra exclusivamente en el cromosoma bacteriano de *Serratia marcescens*, por lo cual su potencial para causar brotes o aparecer frecuentemente como agente causal de una infección se ve limitado, actualmente se han descrito tres variantes del gen: *bla_{SME-1}*, *bla_{SME-2}*, *bla_{SME-3}*. (Walther-Rasmussen & Høiby, 2007).

3.7.3.1.2 Imipenemasa (IMI)

En 1984 en un hospital de California se aisló una cepa de *Enterobacter cloacae* capaz de resistir el efecto de los carbapenémicos, particularmente el imipenem. Tras realizar un análisis se detectó la presencia de una enzima que sería denominada imipenemasa, de la cual los genes que codificaban para su producción (*bla_{IMI}*) se encontraban en el cromosoma bacteriano, razón por la cual su diseminación a nivel mundial es reducida. Cabe destacar que existen reportes de especies de *Enterobacter* que poseen los genes IMI en plásmidos y de las cuales solo se ha reportado un caso clínico en China (Naas et al., 2016).

3.7.3.1.3 Espectro Extendido de Guyana (GES)

Como su nombre lo indica este tipo de enzimas pertenecen a la clasificación de las betalactamasas de espectro extendido (BLEE's), fueron descubiertas en el año 2000 provenientes de un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* realizado en Guyana Francesa, sin embargo existen variantes de GES que presentan actividad contra el imipenem, los genes que codifican para estas enzimas (*bla_{GES}*) se encuentran en

plásmidos aunque la aparición de casos relacionados con la presencia de microorganismos productores de GES son poco frecuentes (Queenan & Bush, 2007).

3.7.3.1.4 Carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae* (KPC)

Actualmente la carbapenemasa de clase A que causa una mayor preocupación a nivel hospitalario ya que se encuentra principalmente en un microorganismo causante de IAAS (*Klebsiella pneumoniae*). Así mismo, la localización plasmídica de los genes que codifican para esta enzima (*bla_{KPC}*) le brinda una capacidad de diseminación de resistencia muy alta entre esta especie. La primer variante de esta familia de enzimas fue descubierta en 1996 en Carolina del Norte, y en los años subsecuentes ha sido detectada en cepas de *Ps. aeruginosa* y *S. marcescens* (Queenan y Bush 2007).

3.7.3.2 Carbapenemasas de clase B (metalobetalactamasas)

Son enzimas capaces de hidrolizar la mayoría de los betalactámicos, exceptuando a los monobactámicos (aztreonam), para esto utilizan cationes de Zinc razón por la cual su actividad se ve inhibida por un agente como el Ácido Etilen Diamino Tetraacético (EDTA) (ver tabla 9). En contraste con las carbapenemasas de clase A, las de clase B no se ven afectadas por el efecto inhibitor del ácido clavulánico y otros inhibidores de betalactamasas, las familias más representativas de estas enzimas son IMP, VIM y NDM (Martínez- Martínez & González-López 2014).

3.7.3.2.1 Imipenemasa (IMP)

El primer caso reportado de una enzima capaz de hidrolizar el imipenem, las penicilinas y las cefalosporinas de amplio espectro, pero sin actividad sobre el aztreonam, fue registrado en Japón en 1990 proveniente de un aislamiento de *Ps. aeruginosa*, del cual su actividad hidrolítica se veía inhibida en presencia de EDTA, pero aumentaba con la adición de Zinc en el medio por lo que se concluyó posteriormente que se trataba de una metalo-betalactamasa, siendo caracterizada en los años siguientes como imipenemasa,

la misma es transferible entre bacterias vía plasmídica, razón por la cual su relevancia en la clínica es elevada (Queenan & Bush, 2007).

3.7.3.2.2 Metalobetalactamasa codificada en Integrón, de Verona (VIM)

Una enzima detectada por primera vez en un aislamiento de *Ps. aeruginosa* en Verona, Italia, en 1997, comparte el 60% de similitud secuencial con las IMP, haciendo que su espectro de hidrólisis sea muy similar. La fácil diseminación de los genes que codifican para esta enzima se debe a que se encuentran en plásmidos. En su mayoría es expresada por *Ps. aeruginosa*, pero existen reportes que demuestran su presencia en otras especies de microorganismos no fermentadores y enterobacterias (Hong et al., 2015).

3.7.3.2.3 Betalactamasa de Nueva Delhi (NDM)

Es la carbapenemasa de clase B de mayor importancia, fue descrita por primera vez en el 2008, presentándose en un paciente de Suecia que había viajado recientemente a la India, la cepa que producía esta enzima era *K. pneumoniae*, posteriormente sería caracterizada y se sabría que estaba codificada en el gen *bla_{NDM}* que se encuentran dentro de plásmidos. En los años recientes se han reportado casos de NDM en todo el mundo, en América latina el primer caso fue reportado en el 2011, y pese a que originalmente se presentaron en *K. pneumoniae* se han encontrado en otras especies de enterobacterias (Resurrección-Delgado et al., 2017).

3.7.3.3 Carbapenemasas de clase D

Están dentro de la clasificación D de las betalactamasas siendo solo pocas variantes de esta familia las que tienen actividad de carbapenemasa, también son denominadas oxacilinasas debido a su capacidad hidrolítica sobre la oxacilina y la penicilina, este tipo de enzimas no hidrolizan las cefalosporinas de amplio espectro, su actividad sobre los carbapenémicos es particularmente débil. La mayoría de las carbapenemasas tipo OXA

han sido descritas en cepas de *Acinetobacter baumannii* exceptuando las carbapenemasas “tipo OXA-48” las cuales se ha descrito en su mayoría en especies de la familia *Enterobacteriaceae* como *K. pneumoniae*. Las enzimas más representativas de esta clase son OXA-48 y las “tipo OXA-48” (Carrascoso, 2016).

3.7.3.3.1 Carbapenemasas OXA-48 y tipo OXA-48

La enzima OXA-48 fue la primer betalactamasa de clase D con actividad de carbapenemasa, detectada en un aislamiento de *K. pneumoniae* en Turquía en 2004, posteriormente se reportó que los genes que codifican para la producción de OXA-48 (bla_{OXA}) se encontraban en plásmidos. Actualmente se han identificado diversas variantes de esta clase de enzimas, como OXA-181, OXA-232 y la variante tipo OXA-48, las cuales comparten una estrecha similitud secuencial con OXA-48 (Poirel et al., 2012).

3.8 Métodos de detección de bacterias resistentes a los carbapenémicos

En el laboratorio existen diversos métodos para la detección de microorganismos resistentes a los carbapenémicos, encontrándose dentro de los más comunes las pruebas de difusión en agar, las reacciones colorimétricas, y las pruebas moleculares, cada una presenta tanto ventajas como desventajas, pero resulta indispensable la realización de una prueba molecular en conjunto con alguna prueba fenotípica para llevar a cabo una detección completa de la resistencia a los carbapenémicos.

3.8.1 Pruebas de difusión en agar

Estas pruebas son empleadas cotidianamente dentro de los laboratorios dado que no son costosas y son fáciles de realizar. Para llevar a cabo estas metodologías es necesario aislar las colonias del microorganismo de interés partiendo de un cultivo primario. La susceptibilidad del aislamiento se evalúa exponiéndola a un antibiótico el cual difundirá en el medio dando como resultado la presencia o ausencia de un halo de inhibición en la placa de agar. Dentro de estas pruebas se encuentran la prueba de los

12 discos, el Test de Hodge Modificado (THM), el Método de Inactivación del Carbapenémico (MIC) y el E-Test (CLSI, 2017).

3.8.2 Pruebas colorimétricas

Los ensayos de este tipo que son utilizados para la detección de microorganismos productores de carbapenemasas y se basan en los cambios de pH que ocurren por la acción de la enzima sobre el antibiótico, lo que genera un viraje en los indicadores utilizados. En el CLSI de 2017 solo se recomienda el uso de la técnica Carba NP sin embargo también hay otras metodologías con fundamento similar como los Chrom-agar y la prueba de Blue Carba Test (Aguirre-Quiñonero & Martínez-Martínez, 2017).

3.8.3 Pruebas moleculares

Las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) son consideradas como las más sensibles para la detección de microorganismos productores de carbapenemasas. Éstas basan en detectar algunas de las secuencias de los genes que codifican para dichas enzimas, sin embargo no pueden ser realizadas por cualquier laboratorio debido a su elevado costo, además de que la gama de genes que se pueden detectar se ve limitada por la plataforma utilizada.

4.0 OBJETIVO

Caracterizar *Klebsiella* spp. resistentes a carbapenémicos aisladas de pacientes que presentaron IAAS en el periodo comprendido entre los años 2012 y 2015 en tres hospitales de la ciudad de México.

4.1 Objetivos específicos

- Analizar el mecanismo por el cual las cepas de *Klebsiella* estudiadas presentan resistencia a los carbapenémicos.
- Identificar el mecanismo de resistencia a los carbapenémicos que se exprese con mayor frecuencia en los aislamientos de *Klebsiella*.
- Generar datos con impacto epidemiológico institucional.
- Evaluar discrepancias entre los resultados obtenidos en las metodologías utilizadas.
- Encontrar ventajas y desventajas de las metodologías para su uso posterior dentro de los laboratorios del ISSSTE.
- Diseñar un algoritmo que optimice la detección de cepas resistentes a los carbapenémicos.

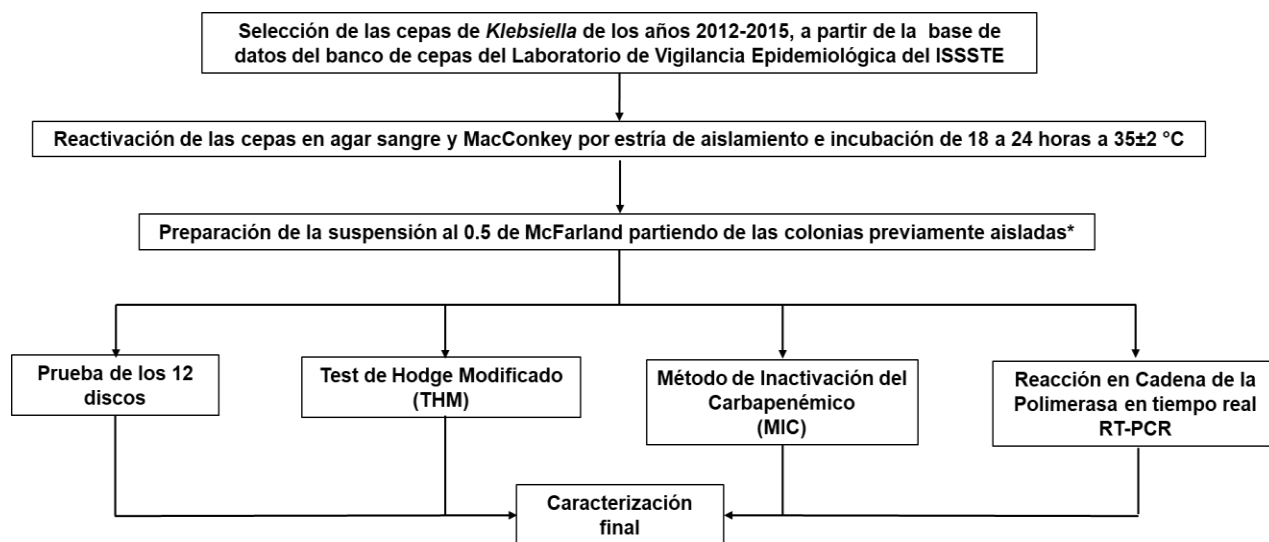
5.0 HIPÓTESIS

H_0 = Todas las cepas estudiadas presentaran resistencia a los carbapenémicos por mecanismos enzimáticos.

H_1 = No todas las cepas estudiadas presentaran resistencia a los carbapenémicos por mecanismos enzimáticos.

6.0 METODOLOGÍA

Se analizaron un total de 53 cepas del género *Klebsiella*, aisladas en el periodo de 2012 a 2015, recuperadas del banco de cepas del Laboratorio de Vigilancia Epidemiológica del ISSSTE (**Anexo C**). Para ser incluidos en el estudio los aislamientos presentaban el fenotipo Productor Potencial de Carbapenemasas (PPC) de acuerdo con la identificación realizada en el equipo BD Phoenix100™ ®. Las cepas fueron reactivadas tanto de un estado de ultracongelación a -70 °C en una mezcla de caldo soya tripticaseína con glicerol al 20% así como de tubos con agar soya tripticaseína que se encontraban a temperatura ambiente. Tras la reactivación en agar sangre y agar MacConkey se procedió a evaluar la morfología colonial y posteriormente a realizar las pruebas correspondientes para identificar el mecanismo de resistencia a los carbapenémicos que presentaban. Para ello se realizaron 4 pruebas, la Prueba de los 12 Discos (P12D), el Test de Hodge Modificado (THM), el Método de Inactivación del Carbapenémico (MIC) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR) para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas (EPC). Este estudio se llevó a cabo con base en el siguiente algoritmo (**ver figura 16**).

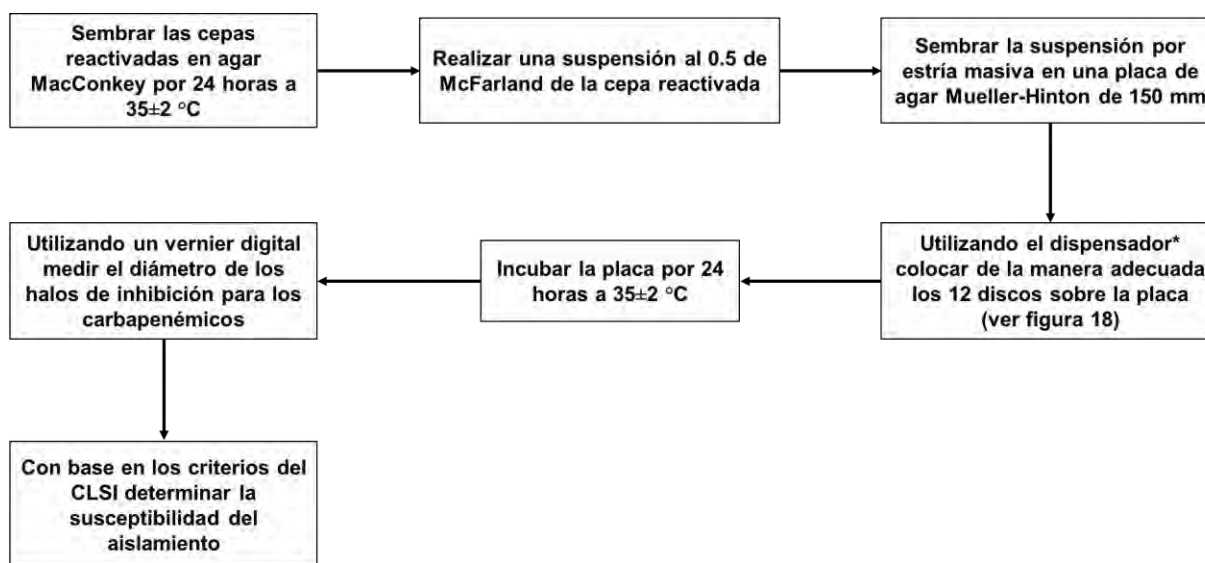


*En caso de que las cepas recuperadas presentaran contaminación, se seleccionaba morfológicamente la colonia resemebrándola en agar MacConkey, y posteriormente siendo identificada nuevamente por medio del equipo BD Phoenix 100®.

Figura 16. Algoritmo general para la caracterización fenotípica y genotípica de *Klebsiella* resistentes a carbapenémicos.

6.2 Prueba de los 12 discos

Tras la reactivación de las cepas se preparó una suspensión al 0.5 de McFarland, la cual se sembró por estría masiva en una placa de agar Mueller-Hinton de 150 mm para posteriormente colocar sobre la misma los discos con los antibióticos mediante el uso del dispensador*, dispensados los discos, se incubaron las placas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, luego de la incubación se midieron los halos de inhibición utilizando un vernier digital. Todo el procedimiento descrito anteriormente queda representado en las **figuras 17 y 18**.



*El dispensador utilizado para esta prueba fue: BD BBL™ Sensi-Disc™ Designer Dispenser.

Figura 17. Algoritmo para la prueba de los 12 discos

6.2.1 Controles de calidad para la prueba de 12 discos

Para llevar a cabo el control de calidad de la prueba se evaluaron las siguientes cepas:

- 1) *E. coli* ATCC 25922, la cual presenta sensibilidad a todos los antibióticos probados **ver figura 30**.
- 2) *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705, genotipificada como un microorganismo productor de carbapenemasas de tipo KPC (**Ver anexo B**).

3) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706, identificada como un microorganismo que presenta cierre de porinas como mecanismo de resistencia a los carbapenémicos (**Ver anexo B**).

6.2.2 Esquema para el montaje de la prueba de los 12 discos

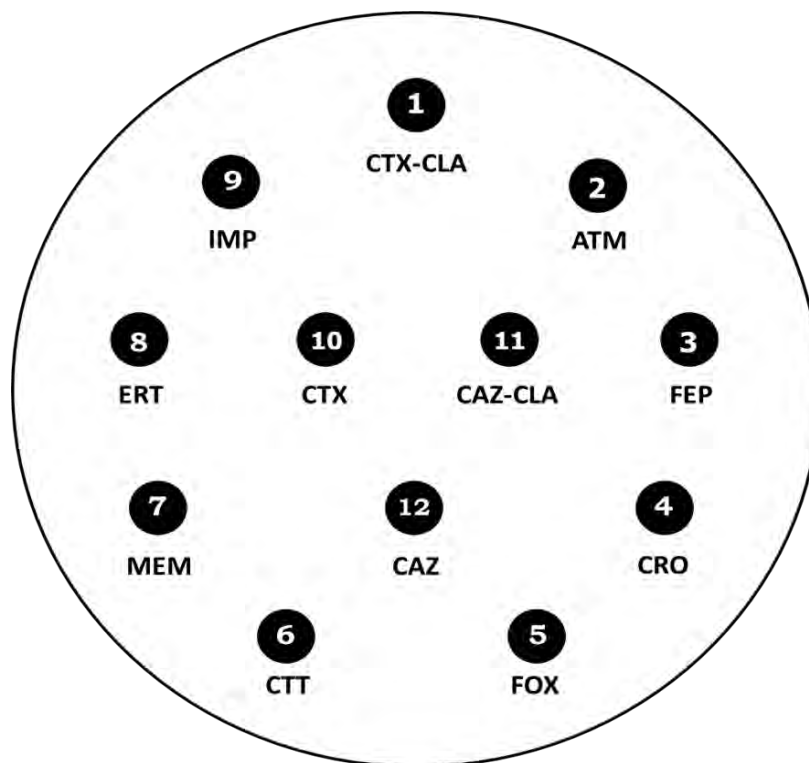


Figura 18. Orden de los antibióticos para la prueba de los 12 discos. Fuente: Schreckenberger & Rekasius, 2012.

Tabla 9. Antibióticos utilizados para la prueba de los 12 discos. Fuente: Schreckenberger & Rekasius, 2012.

Antibióticos para la prueba de los 12 discos			
1	Cefotaxima/Ácido clavulánico (CTX-CLA)	7	Meropenem (MEM)
2	Aztreonam (ATM)	8	Ertapenem (ETP)
3	Cefepime (FEP)	9	Imipenem (IMP)
4	Ceftriaxona (CRO)	10	Cefotaxima (CTX)
5	Cefoxitina (FOX)	11	Ceftazidima/Ácido clavulánico (CAZ-CLA)
6	Cefotetan (CTT)	12	Ceftazidima (CAZ)

6.3 Test de Hodge Modificado (THM)

Para la prueba del THM se realizó una suspensión al 0.5 de McFarland de la cepa *E. coli* ATCC 25922 en un tubo de 4.5mL de solución ID Broth, posteriormente se diluyó 1:10, para sembrarse por estría masiva en una placa de agar Mueller-Hinton a la que se le colocó un disco de meropenem (10 µg) en el centro. Sobre la placa inoculada se colocaron mediante estría recta el control positivo *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705, el control negativo *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706 y la muestra problema (cepa reactivada) partiendo del borde del disco hacia la orilla de la placa para finalmente incubar a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ de 16 a 24 horas para su posterior interpretación. El proceso anterior queda descrito en las **figuras 19 y 20**.

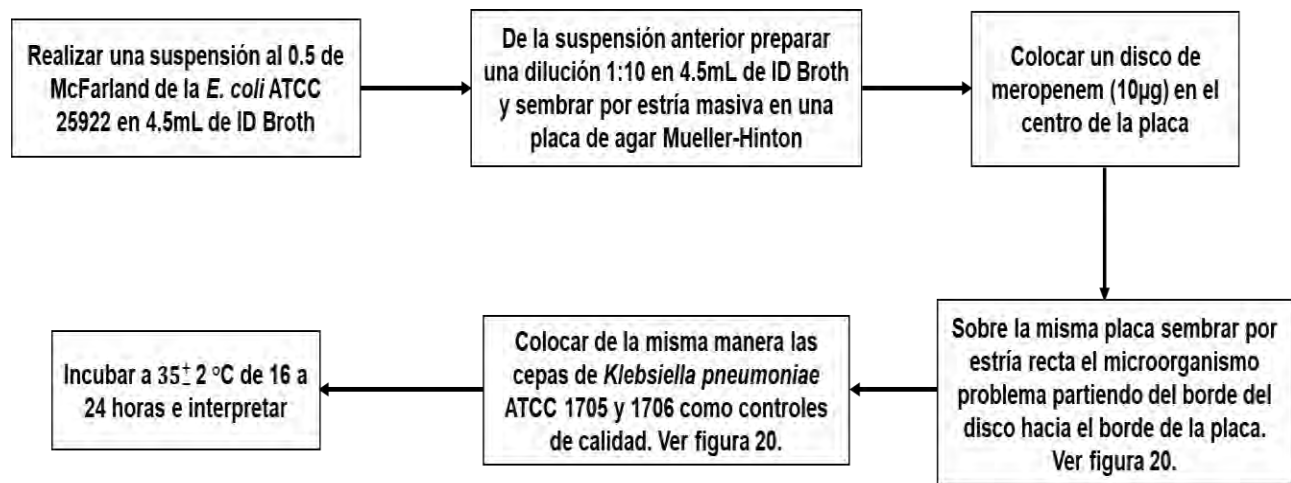


Figura 19. Algoritmo de la prueba del Test de Hodge Modificado.

6.3.1 Esquema del montaje del Test de Hodge Modificado

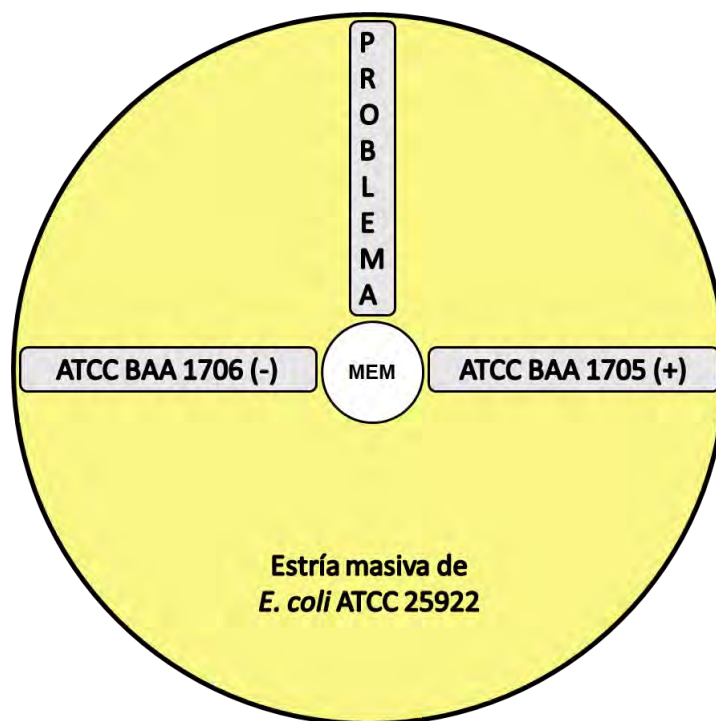


Figura 20. Esquema de montaje del Test de Hodge Modificado

6.4 Método de Inactivación del Carbapenémico (MIC)

Para el MIC se siguió lo descrito por Van der Zwaluw et al. (2015). Una asada de la cepa problema se suspendió en 400 μ L de agua desionizada, posteriormente se agregó un disco de meropenem (10 μ g) a dicha preparación, luego se incubó a 35 ± 2 °C por dos horas. Transcurrido ese tiempo se retiró el disco de meropenem de la suspensión y se colocó en el centro de una placa de agar Mueller-Hinton donde previamente se había inoculado por estría masiva la cepa de *E. coli* ATCC 25922 para finalmente incubar la placa 35 ± 2 °C por aproximadamente de 16 a 18 horas. El proceso anterior queda descrito en las **figuras 21 y 22**. Se usaron como controles:

Control positivo: *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 y *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706.

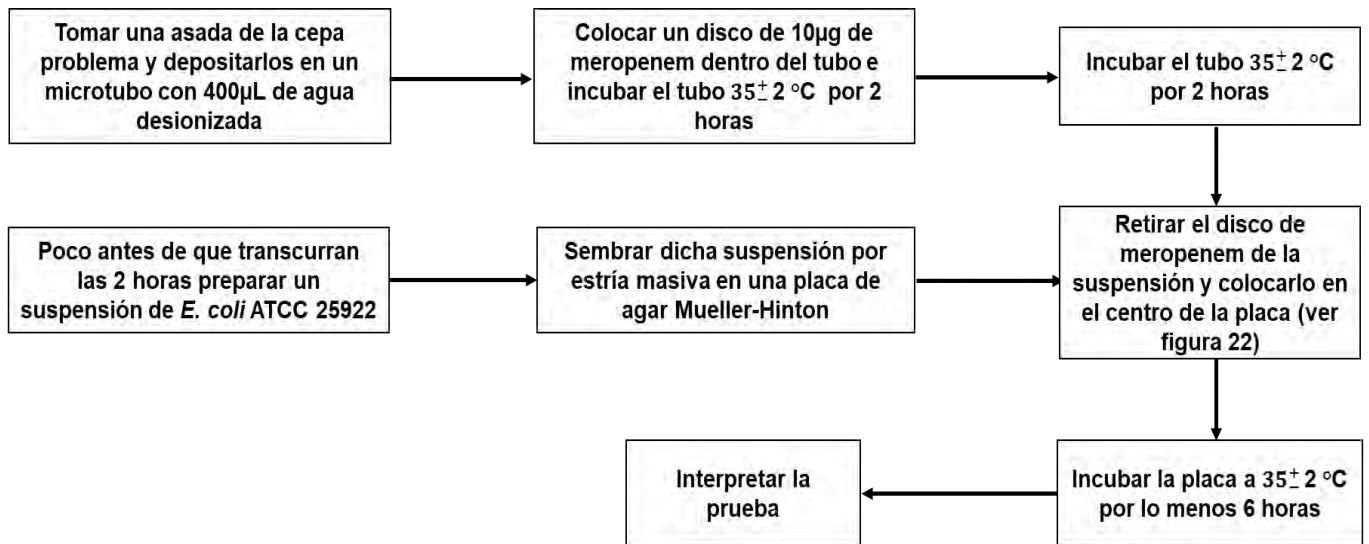


Figura 21. Algoritmo para el Método de Inactivación del Carbapenémico.

6.4.1 Esquema del montaje del MIC



Figura 22. Esquema del montaje del Método de Inactivación del Carbapenémico.

6.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR)

La PCR se realizó siguiendo el protocolo establecido para BD MAX CRE assay, para lo cual se preparó una solución al 0.45 de McFarland de la muestra problema, luego se tomaron 10 µL de la misma para depositarse en el tubo con buffer de lisis propio del kit, posteriormente se agitó el tubo 60 segundos por en un vórtex y se colocó en la gradilla donde también se encontraba colocada la tira reactiva con los elementos necesarios para llevar a cabo la reacción, finalmente se introdujo la gradilla dentro del equipo cargado con el cartucho de PCR y se inició la prueba.

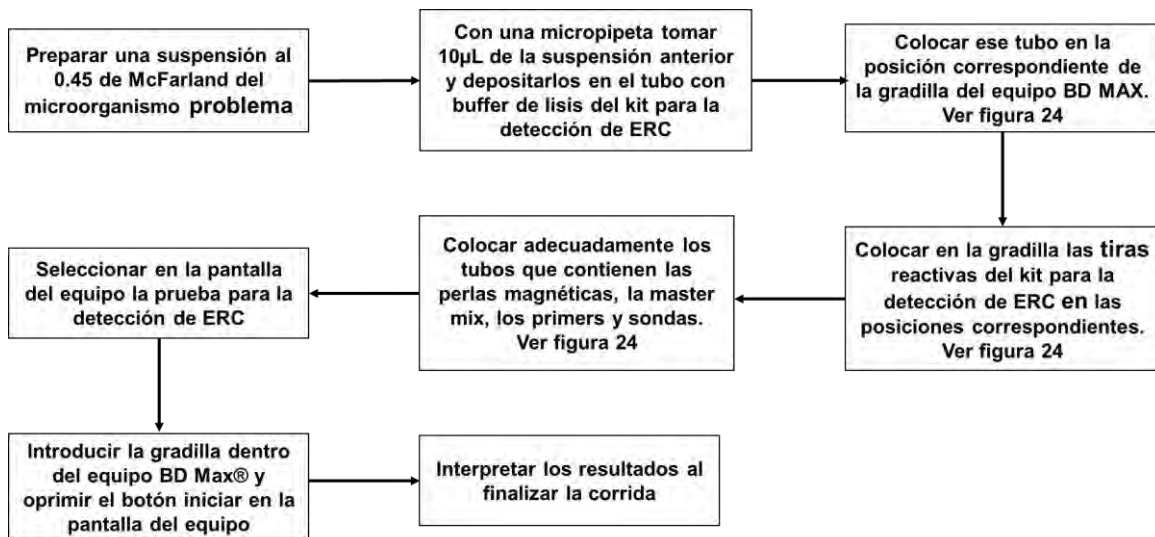


Figura 23. Algoritmo de la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas.



Figura 24. Montaje de la gradilla para llevar a cabo la RT-PCR.

7.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Resultados generales

Se analizaron un total de 53 cepas con el fenotipo Productor Potencial de Carbapenemasas (PPC) de acuerdo con la identificación automatizada del equipo BD Phoenix 100™, encontrándose tres especies diferentes del género *Klebsiella*, 49 de los aislamientos (92%) fueron *K. pneumoniae*, tres (6%) *K. oxytoca* y uno (2%) fue *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*. **Figura 25.**

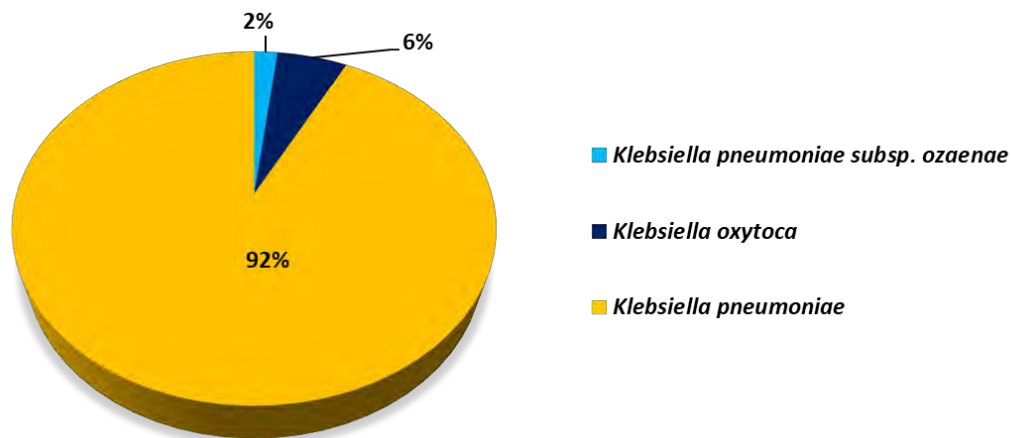


Figura 25. Especies del género *Klebsiella* utilizadas en el estudio.

La proporción de las diferentes especies analizadas concuerdan con lo reportado por la OMS y con el reporte anual de la RHOVE 2015, donde se dice que los principales agentes causantes de infecciones en humanos del género *Klebsiella*, son *K. pneumoniae*, seguido por *K. oxytoca*, de la misma manera se puede constatar que *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* genera infecciones muy rara vez en humanos.

Estos aislamientos fueron obtenidos de tres hospitales del ISSSTE en la Ciudad de México de acuerdo con la siguiente distribución (**Figura 26**). El Centro Médico Nacional “20 de noviembre” fue el que aportó más cepas resistentes a los carbapenémicos, lo cual puede deberse al nivel de atención y al tipo de servicios que presta este hospital, ya que en él se atienden pacientes con un mayor compromiso inmunitario que en los otros dos nosocomios.

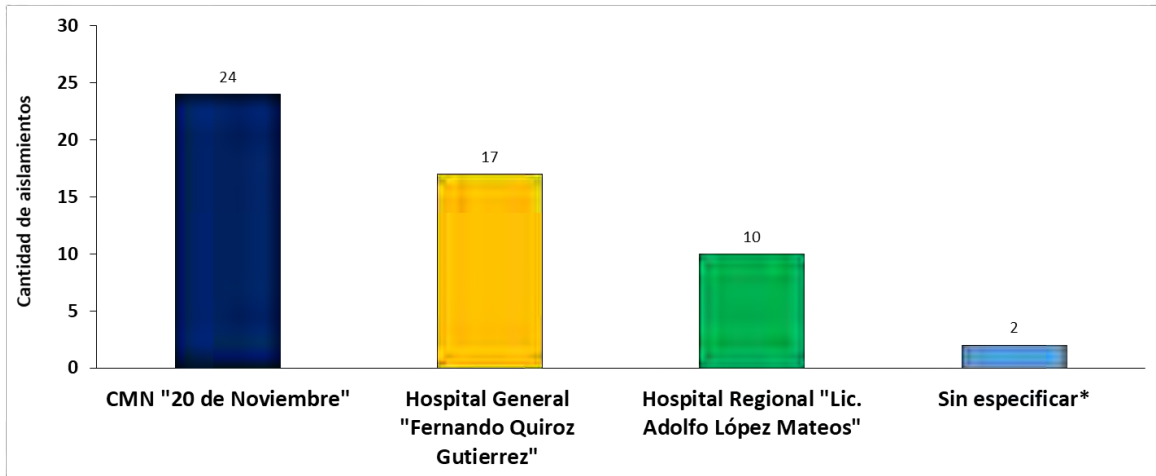


Figura 26. Distribución de los aislamientos por hospital de origen. (*) En el caso de estos aislados, el sistema de gestión de datos no permitió la recuperación de la información de procedencia de los mismos.

De acuerdo con la base de datos de la que se seleccionaron las cepas, estas fueron aisladas de diversos tipos de muestras (ver anexo A tabla 1), como puede observarse en la figura 27.

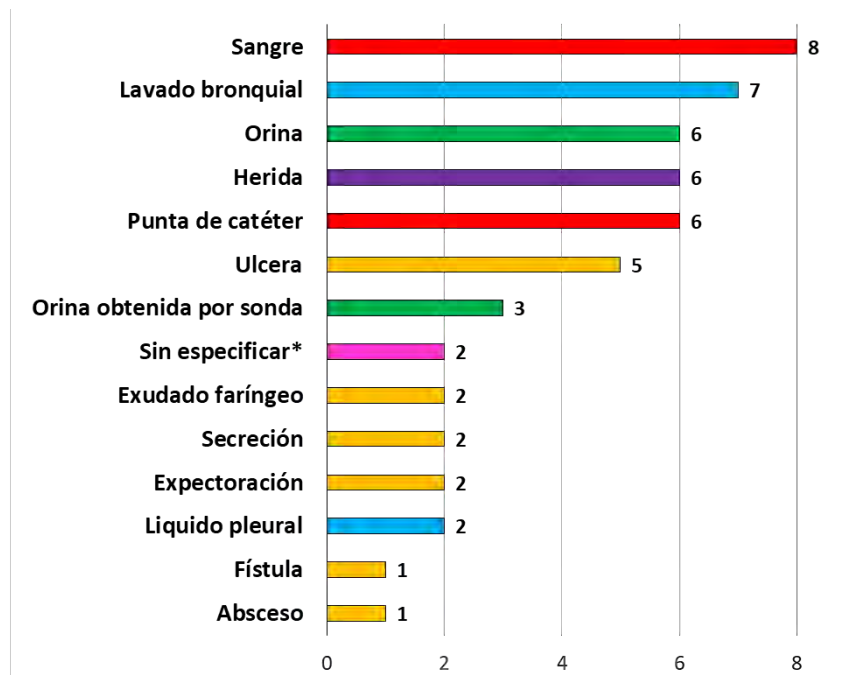


Figura 27. Distribución de los aislamientos por tipo de muestra. (*)En el caso de estos aislados, el sistema de gestión de datos no permitió la recuperación de la información referente al tipo de muestra de dónde provino el microorganismo.

Se puede ver que no hay un tipo de muestra predominante, pero de acuerdo al diagnóstico presuntivo con el que se registraron las muestras originalmente se infiere que las barras rojas (hemocultivo, punta de catéter) se asocian a Infecciones del Torrente Sanguíneo (ITS), las barras azules (lavado bronquial, líquido pleural) se relacionan con infecciones de las vías respiratorias bajas como las neumonías asociadas a ventilador, las verdes (orina, sonda) a Infecciones de Vías Urinarias (IVU), mientras que la barra morada estaría relacionadas con Infecciones del Sitio Quirúrgico (ISQ). Basándonos en la clasificación de las IAAS de la RHOVE, en la cual las mismas aparecen como las principales IAAS en las instituciones hospitalarias del país. Por otra parte, las barras amarillas se considerarían dentro del grupo “otras” de la RHOVE que toma en cuenta tipos de infecciones que no ocurren con mucha frecuencia en los servicios hospitalarios.

7.2 Resultados del equipo automatizado

Los 53 aislamientos estudiados presentaron el fenotipo PPC con base en el resultado del antibiograma emitido por el equipo BD Phoenix 100®, para presentar este fenotipo los microorganismos fueron resistentes a por lo menos uno de los tres carbapenémicos probados (ertapenem, imipenem, meropenem). Obteniéndose que 46 (86.8%) de los 53 aislamientos fueron resistentes a los tres carbapenémicos, cuatro (7.5%) solamente a dos, y tres (5.7%) solo a uno (**figura 28**).

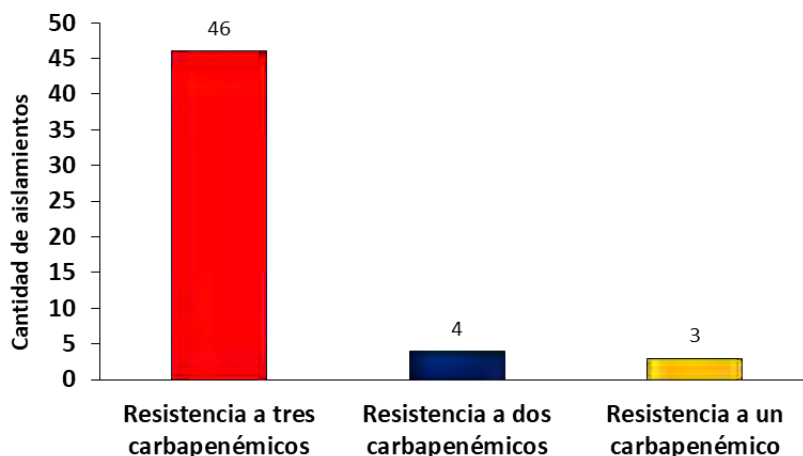


Figura 28. Perfil de susceptibilidad a los diferentes carbapenémicos evaluados.

7.3 Prueba de los 12 Discos (P12D)

La interpretación de la P12D se realizó tomando en cuenta lo descrito por Schreckenberger & Rekasius (2012), donde si un organismo es productor de carbapenemasas se deben medir los halos de inhibición generados por el antibiótico en la zona correspondiente a los carbapenémicos (ertapenem, imipenem, meropenem) de acuerdo con lo esquematizado en la **figura 29**, y siguiendo los criterios establecidos por el CLSI para la susceptibilidad, el organismo se clasificará en tres categorías: Susceptible (S), Intermedio (I) y Resistente (R) a los carbapenémicos.

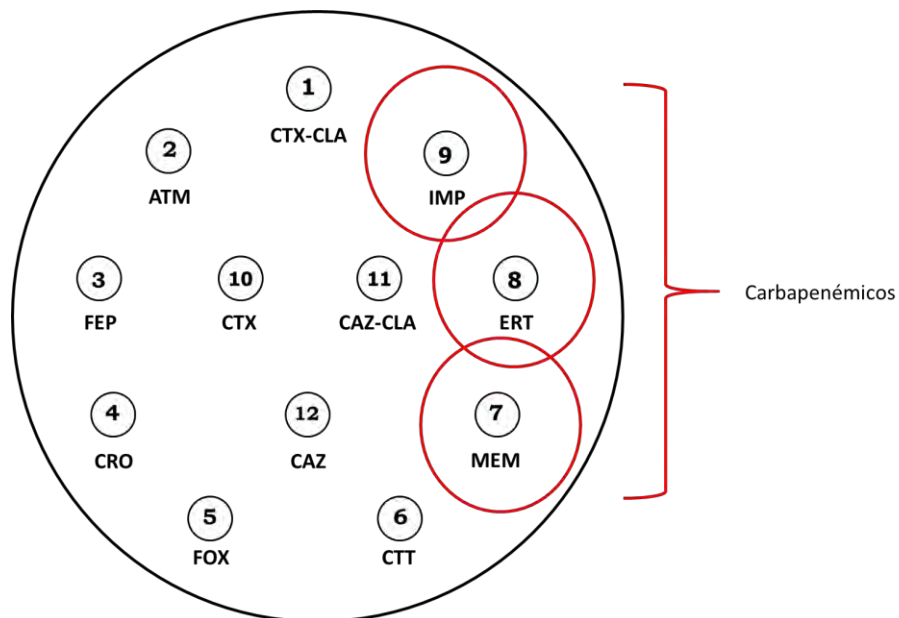


Figura 29. Zona de los carbapenémicos de acuerdo con plantilla de la prueba de los 12 discos.

Los valores de corte epidemiológicos establecidos por el CLSI (2017) para determinar la sensibilidad de enterobacterias a los carbapenémicos se muestra en la **tabla 10**. Cabe resaltar que los microorganismos que entran en la categoría de susceptibilidad intermedia, clínicamente se pueden considerar como resistentes ya que la eficacia terapéutica del fármaco se ve comprometida, sin embargo, epidemiológicamente se tendría que corroborar mediante técnicas más específicas de determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Tabla 10. Puntos de corte y categorías para interpretar pruebas de difusión en disco para enterobacterias, CLSI (2017).

Antibiótico	Concentración	Categorías de interpretación y diámetros en mm para los valores de corte epidemiológicos		
		Susceptible (S)	Intermedio (I)	Resistente (R)
Ertapenem	10 µg	≥ 22	19-21	≤ 18
Imipenem	10 µg	≥ 23	20-22	≤ 19
Meropenem	10 µg	≥ 22	20-22	≤ 19

Fuente: Modificada CLSI (2017)

7.3.1 Control de calidad de la Prueba de los 12 Discos

Así mismo se utilizó una cepa control (*E. coli* ATCC 25922) la cual es susceptible a todos los antibióticos de la prueba de acuerdo con los criterios establecidos por el CLSI (2017).

Ver figura 30.

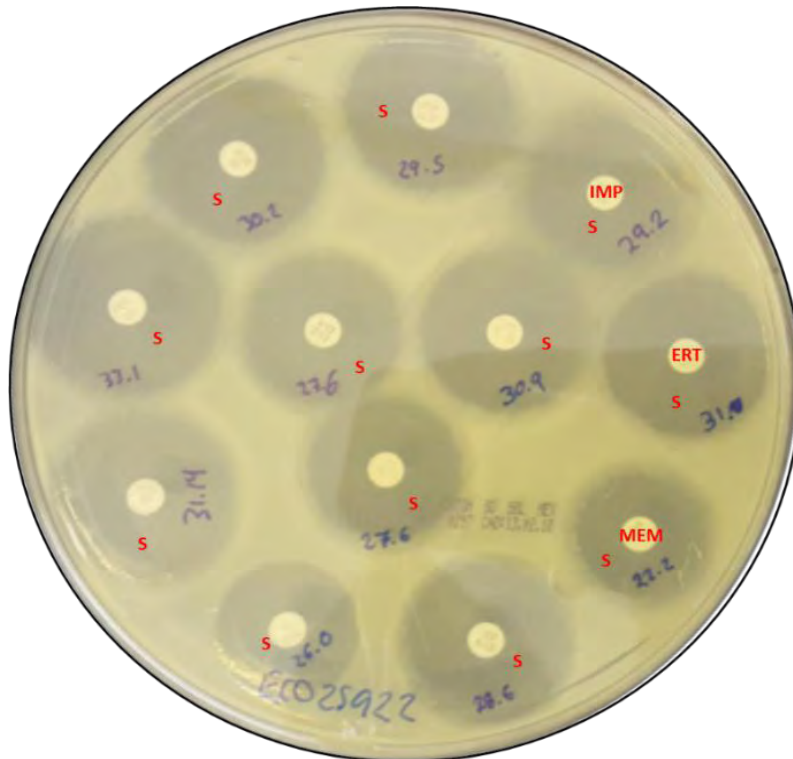


Figura 30. Resultado de la prueba de los 12 discos para la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Luego de la realización de la prueba de los 12 discos se obtuvieron los siguientes resultados:

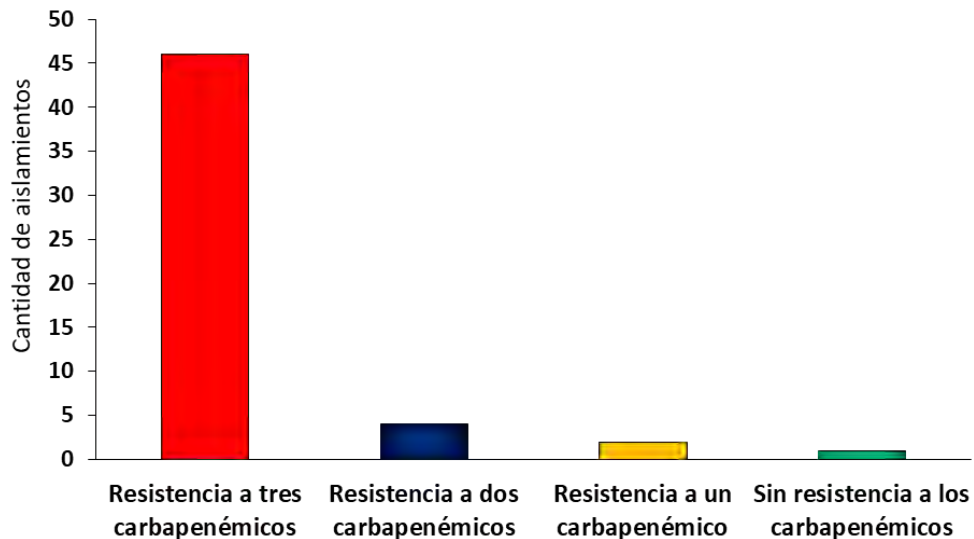


Figura 31. Perfil de susceptibilidad a los diferentes carbapenémicos evaluados en la prueba de los doce discos.

La P12D permitió confirmar que 47 (88.7%) de los microorganismos presentaron resistencia a los tres carbapenémicos, de manera similar a lo mostrado en la **figura 32**, dos cepas (3.8%) fueron resistentes a dos de los tres carbapenémicos en similitud a lo mostrado en la **figura 33**. Solo tres microorganismos (5.7%) tuvieron resistencia a uno de los tres carbapenémicos probados **figura 34**. Finalmente, esta prueba determinó que uno de los aislamientos (1.9%) no era resistente a los carbapenémicos (**ver figura 35**) pese que había resultado con el fenotipo PPC en el equipo automatizado donde presentó resistencia a ertapenem, por lo cual fue excluido de las pruebas posteriores, como lo muestra la tabla uno del **anexo A tabla 1 (aislamiento 11)**.

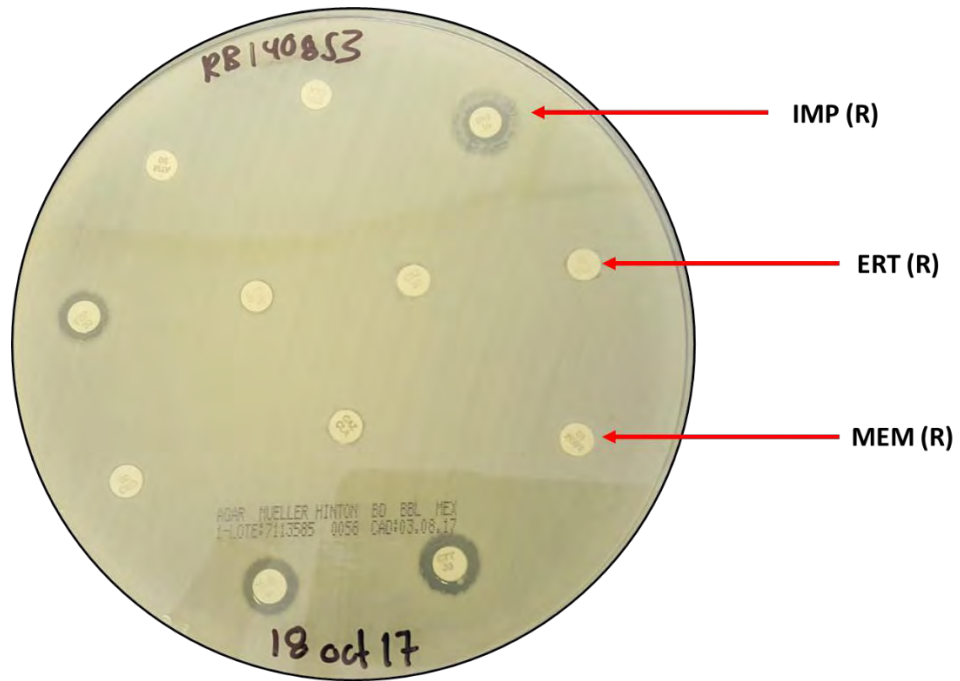


Figura 32. Resultado de la prueba de los 12 discos para una cepa resistente a los tres carbapenémicos.

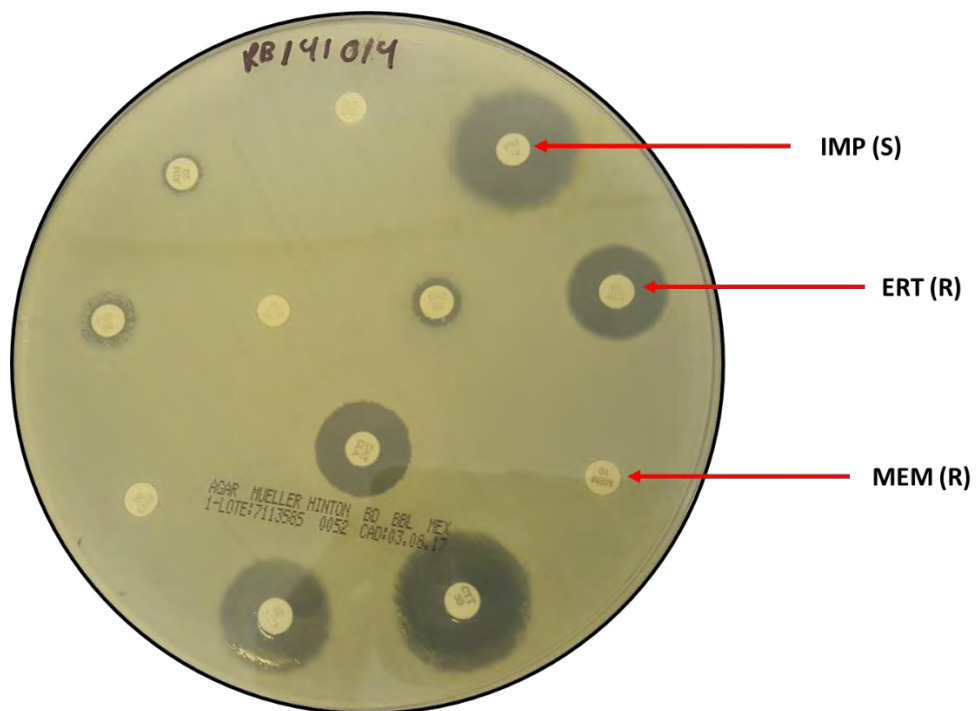


Figura 33. Resultado de la prueba de los 12 discos para una cepa con susceptibilidad a dos carbapenémicos ertapenem y meropenem.

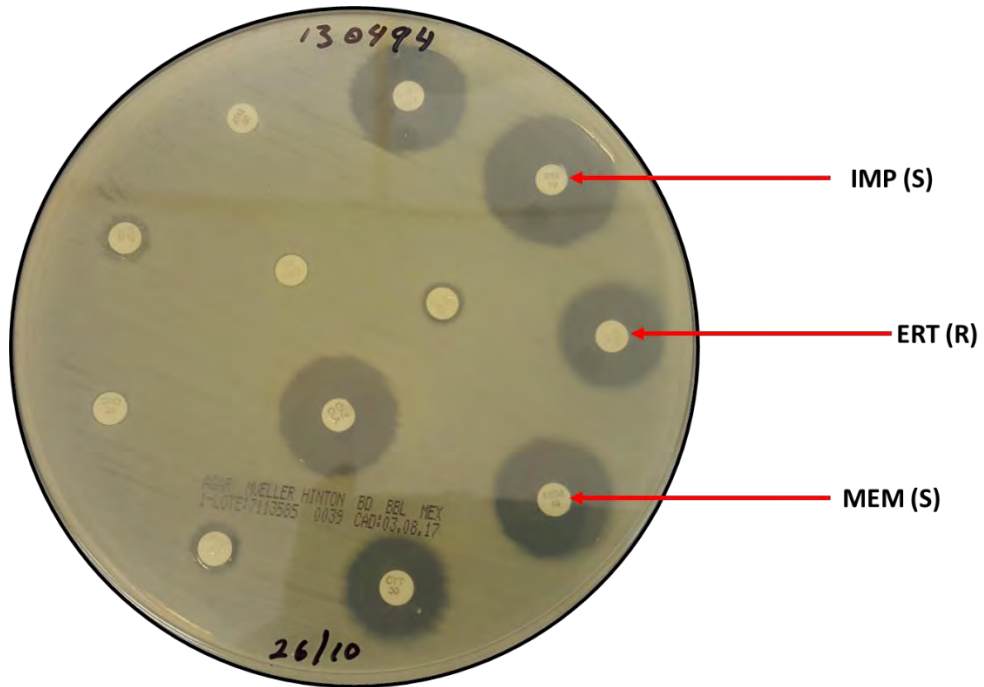


Figura 34. Resultado de la prueba de los 12 discos para una cepa con susceptibilidad únicamente a ertapenem.

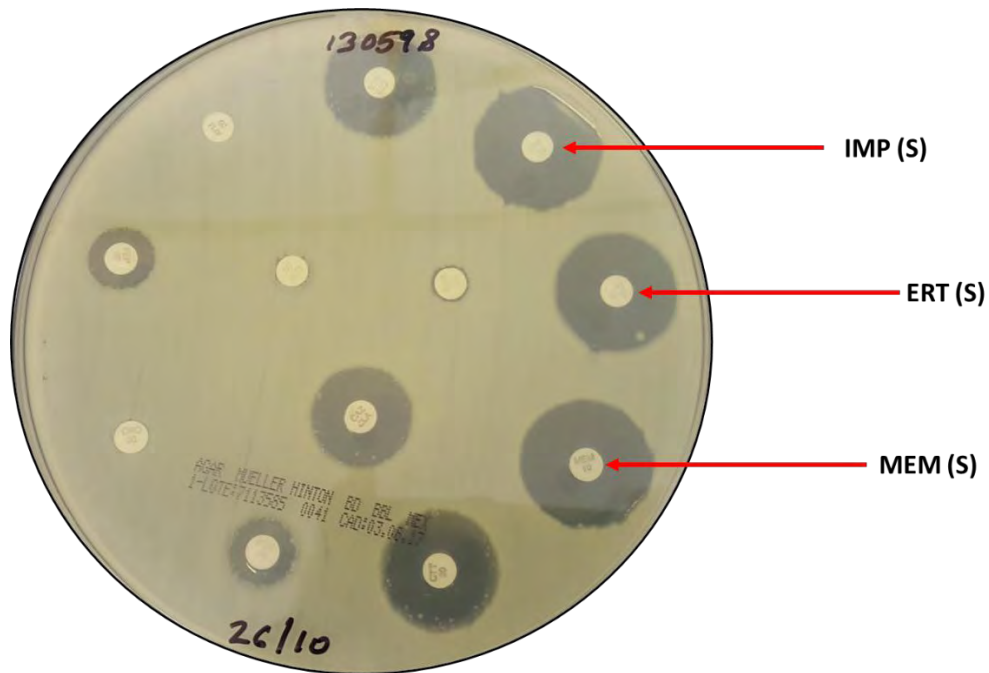


Figura 35. Resultado de la prueba de los 12 discos para una cepa susceptible a todos los carbapenémicos.

Se realizó el análisis de la resistencia a cada carbapenémico, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 11. Perfiles de susceptibilidad a los diferentes carbapenémicos.

Microorganismo	Perfil de susceptibilidad en la prueba de P12D					
	Ertapenem		Imipenem		Meropenem	
	S	R	S	R	S	R
<i>K. pneumoniae</i>	4	45	6	43	1	48
<i>K. oxytoca</i>	0	3	0	3	0	3
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	0	1	0	1	0	1
Total	4	49	6	47	1	52

En la tabla anterior se observa que la mayoría de los aislamientos fueron resistentes a meropenem (52, 98.11%), lo que puede atribuirse a que este fármaco está siendo utilizado con mayor frecuencia en la actualidad. La susceptibilidades a los tres carbapenémicos fueron bastante bajas para todos los microorganismos sin embargo el imipenem fue el que presentó un valor más alto (6, 11.32%) atribuible a que este se administra tomando en cuenta la función renal del paciente por tanto no se usa con tanta frecuencia como el meropenem.

7.4 Test de Hodge Modificado (THM)

El THM se interpretó con base en los criterios del CLSI versión 2017, según el cual un aislamiento productor de carbapenemasas (principalmente de clase A) permite el crecimiento de la cepa de *E. coli* ATCC 25922 a lo largo de la estría de la muestra problema, generando un efecto visual denominado “hoja de trébol”, el cual se debe al gradiente de concentración que ocurre por la difusión del antibiótico en la placa de agar y a la actividad enzimática del microorganismo. Los aislamientos no productores de carbapenemasas no generan dicho efecto, y el halo de inhibición puede apreciarse sin cambios (**Figura 37**).

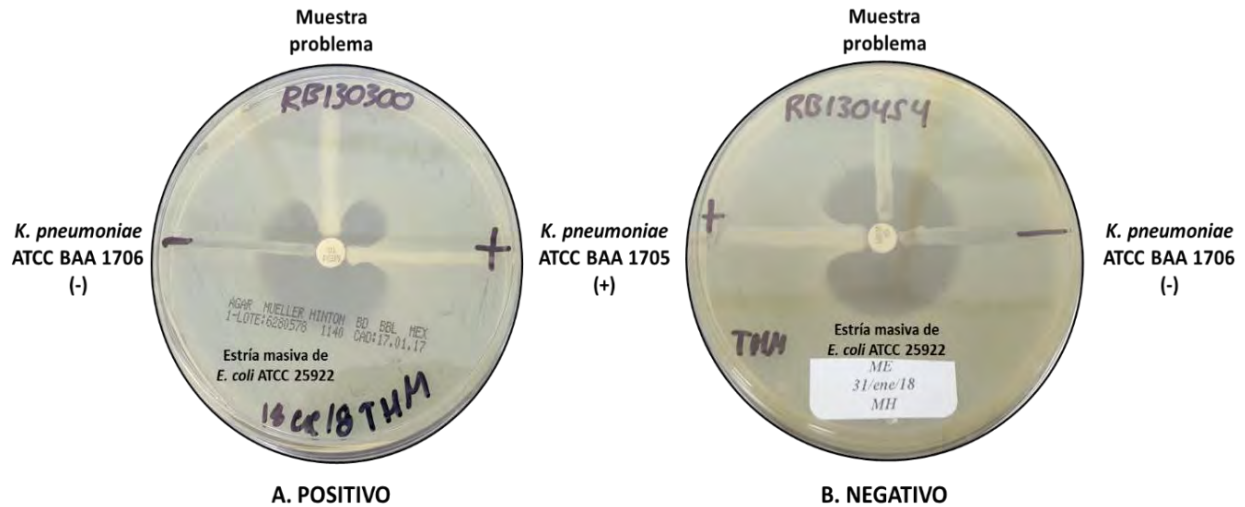


Figura 37. Imágenes del resultado obtenido para la prueba del THM. La imagen A muestra un aislamiento positivo (productores de carbapenemasas) donde se observa el efecto de hoja de trébol característico formado entre la estría del control positivo (*K. pneumoniae* ATCC BAA 1705) y la muestra problema. En la figura B se muestra un aislamiento negativo para el THM (no productores de carbapenemasas) donde no se observa un cambio en la forma del halo de inhibición.

Para esta prueba los resultados indicaron que 42 (79.2%) de los 53 aislamientos se pueden considerar como productores de carbapenemasas mientras que los otros 11 (20.8%) no indicaron resultaron productores de carbapenemasas como lo muestra la **figura 38**.

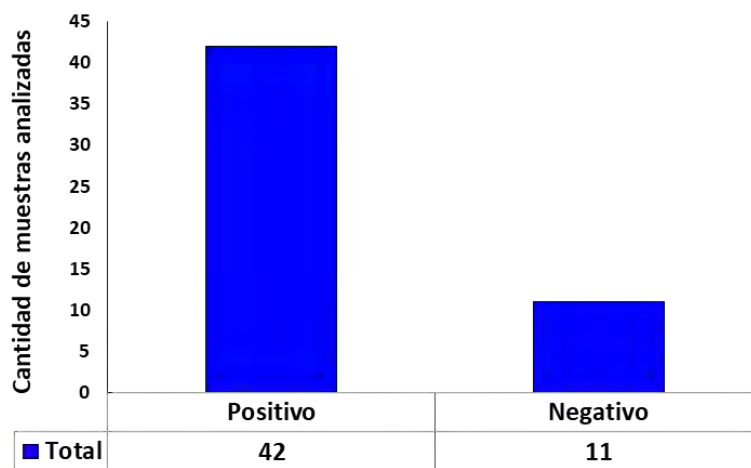


Figura 38. Resultados obtenidos en la prueba del Test de Hodge Modificado

7.5 Método de Inactivación del Carbapenémico (MIC)

El MIC fue interpretado siguiendo lo establecido por Van der Zwaluw 2015 donde se menciona que un resultado positivo implica la presencia de cepas productoras de carbapenemasas (principalmente de clase A). Lo anterior se debe a que durante la incubación de dos horas de la cepa con el antibiótico las enzimas lo hidrolizan, permitiendo que la cepa de *E. coli* ATCC 25922, que es susceptible a meropenem, pueda crecer sobre toda la superficie de la placa de agar Mueller-Hinton, opuesto a las cepas que dan un resultado negativo en las cuales el meropenem ejerce su efecto generando un halo de inhibición en la placa. **Ver figura 39.**

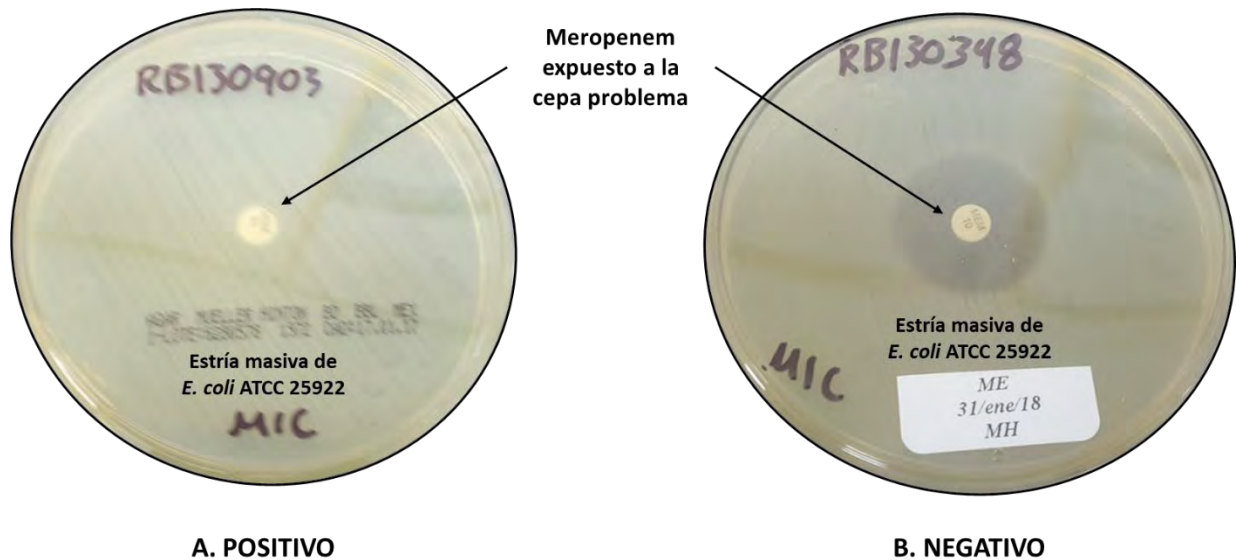


Figura 39. Imágenes del resultado obtenido para la prueba del MIC, la imagen A muestra un aislamiento positivo (productor de carbapenemasas). En la imagen B aparece un aislamiento negativo (no productor de carbapenemasas).

7.5.2 Resultados

En la prueba del MIC 41 (77.4%) de los aislamientos resultaron positivos mientras que 12 (22.6%) no presentaron actividad sobre el antibiótico (**Figura 40**).

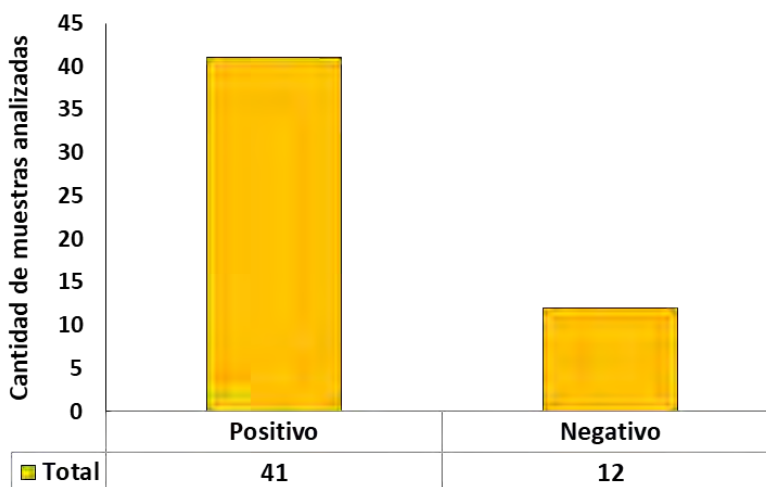


Figura 40. Resultados obtenidos en la prueba del MIC

7.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR)

Los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa fueron interpretados de acuerdo con lo indicado en el inserto del kit para la detección de enterobacterias resistentes a los carbapenémicos (BD Max CRE™ Assay) mostrado en la **tabla 12**.

Tabla 12. Interpretación de los resultados de la RT-PCR.

Resultado en el equipo	Interpretación
KPC (+)	Gen <i>bla</i> _{KPC} detectado
OXA 48 (+)	Gen <i>bla</i> _{OXA} detectado
NDM (+)	Gen <i>bla</i> _{NDM} detectado
Negativo (-)	Gen <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{OXA} o <i>bla</i> _{NDM} No detectado

Los resultados de la RT-PCR fueron los siguientes (**Figura 42**):

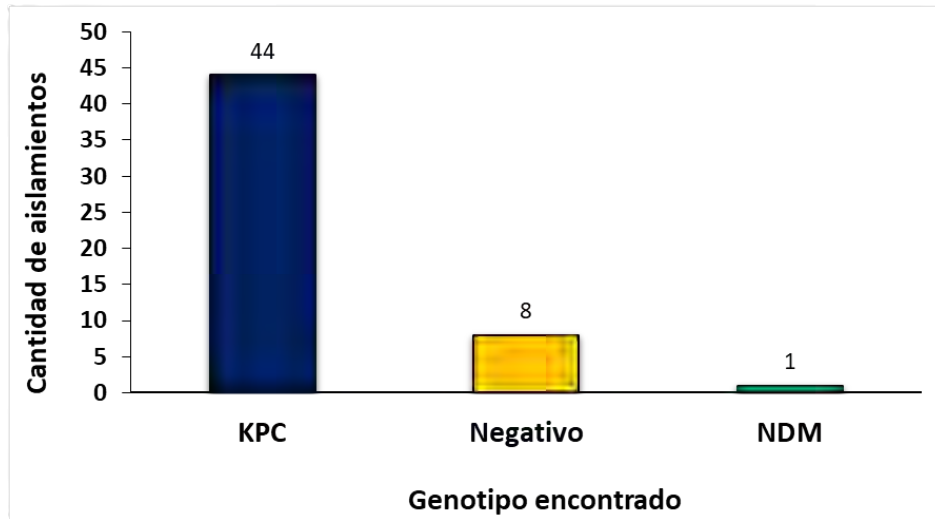


Figura 42. Resultados obtenidos para la prueba de RT-PCR.

En la figura anterior puede observarse que el genotipo predominante fue KPC con 44 aislamientos (83.0%), en ocho (15.1%) de los microorganismos ningún gen de resistencia fue detectado por medio de la plataforma y uno (1.9%) presentó el genotipo NDM.

7.7 Análisis global

Tras la realización de la RT-PCR y las pruebas fenotípicas se pudo generar un gráfico que describe la especie del microorganismo asociada a su genotipo (**ver figura 43**) el cual nos muestra que *K. pneumoniae* es el microorganismo que porta el gen bla_{KPC} con mayor frecuencia corroborando lo reportado por diversos artículos a nivel mundial (Van Duin & Doi, 2017).

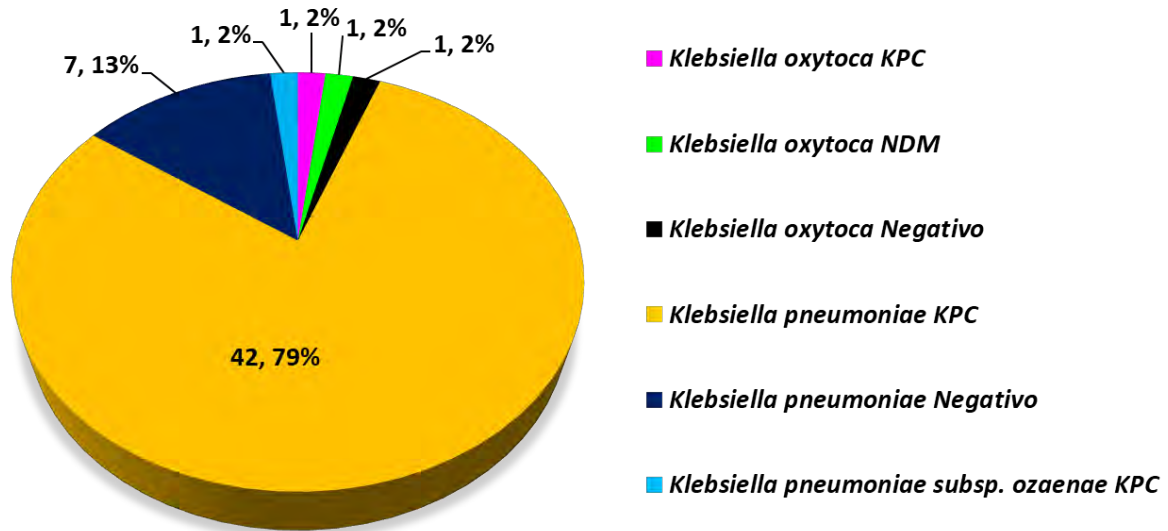


Figura 43. Distribución de los microorganismos estudiados y su genotipo encontrado.

La presencia de aislamientos de este tipo de microorganismos en el ISSSTE se remonta a 2012, encontrándose similitud con el periodo en el que se reportó por primera vez un aislamiento semejante en el país, en el año 2010 (Rodríguez-Zulueta et al., 2013). De igual manera se encontró la presencia del genotipo NDM en una cepa de *K. oxytoca* del año 2014, a pesar de que no se ha descrito a esta especie como un portador frecuente del gen *bla_{NDM}*, resulta congruente con el periodo de tiempo en el cual apareció en el país, basándonos en los reportes que notifican cepas portadoras de este gen ocurridos en 2013 y 2015 (Barrios et al. y Torres-González et al. 2013), y a la baja frecuencia con la que se presentó (1.9%) en el estudio.

La mayoría de las cepas que se caracterizaron presentaron mecanismos enzimáticos de resistencia a los carbapenémicos, que involucran la presencia de los genes *bla_{KPC}* y *bla_{NDM}*, sin embargo, estos mecanismos no se presentaron en la totalidad de las cepas lo que descarta la hipótesis nula, aceptándose la hipótesis alterna debido a la presencia de aislamientos de *Klebsiella* resistentes a los carbapenémicos. Estos microorganismos podrían presentar mecanismos no enzimáticos como el cierre/pérdida de porinas o bombas de eflujo, lo cual tendría que ser demostrado mediante metodologías diferentes a las utilizadas en este ensayo tales como: la determinación de la concentración mínima

inhibitoria por diluciones seriadas en caldo, pruebas colorimétricas que por su fundamento del cambio de pH en el medio donde se realiza la prueba aportan información de la hidrólisis del antibiótico. Las pruebas mencionadas permitirían suponer la presencia de mecanismos enzimáticos por encima de mecanismos de resistencia no enzimáticos. Así mismo también se podrían realizar otros estudios de biología molecular como la PCR convencional para la determinación de genes involucrados con bombas de eflujo o la conformación de las porinas.

Algunos de estos casos son esquematizados por las **figuras 44 y 45** donde se ejemplifica el posible mecanismo de resistencia en la descripción de la figura.

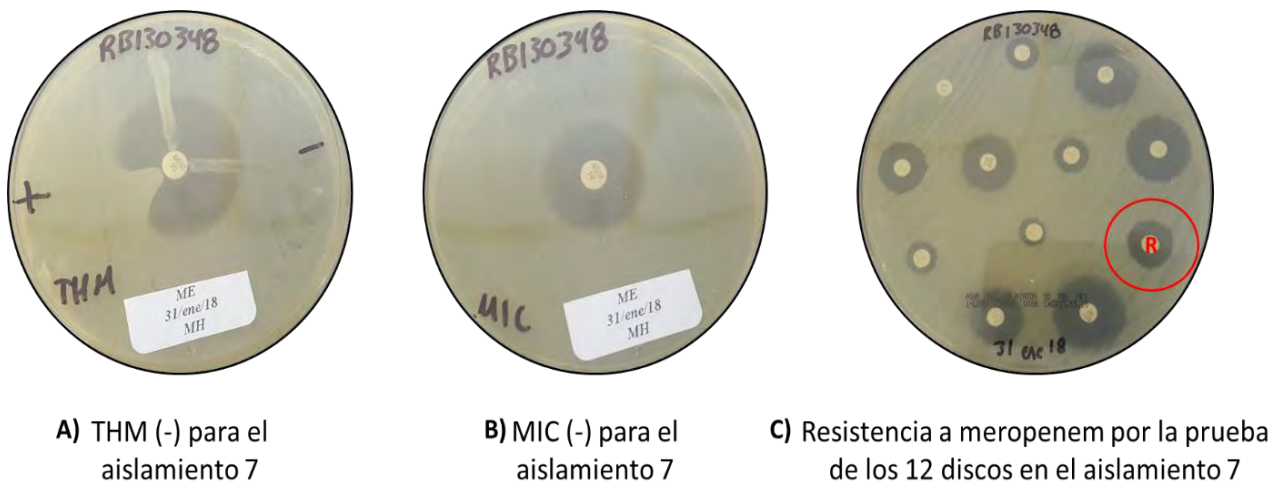


Figura 44. Resultados obtenidos para el aislamiento 7 el cual solo presentó resistencia a meropenem en la P12D. A) THM negativo, B) MIC negativo y C) Resistencia solamente a meropenem, esta cepa puede que posea un mecanismo particular como el cierre o pérdida de porinas o las bombas de eflujo que son selectivos para determinados antibióticos. **Ver anexo A tabla 2.**



A) THM (-) para el aislamiento 11

B) MIC (-) para el aislamiento 11

C) Resistencia a ertapenem en la prueba de los 12 discos para el aislamiento 11

Figura 45. Resultados obtenidos para el aislamiento 11 el cual solo presentó resistencia únicamente a ertapenem desde el resultado del equipo automatizado hasta las pruebas fenotípicas. A) THM negativo, B) MIC negativo y C) Resistencia solamente a ertapenem e intermedio para imipenem y meropenem, esta cepa puede que posea un mecanismo particular como el cierre o pérdida de porinas o las bombas de eflujo que son selectivos para determinados antibióticos. **Ver anexo A1 tabla 2.**

El hallazgo de cepas con mecanismos de resistencia transferibles por medio de plásmidos en los hospitales del ISSSTE en el periodo de tiempo estudiado nos permite dimensionar la magnitud el problema de la resistencia a los antibióticos de última línea de la familia de los betalactámicos. De igual manera nos ayuda a sentar las bases para detectar la presencia de este tipo de microorganismos de manera rápida y confiable permitiendo que se lleve a cabo la toma de decisiones oportuna y una mejora en la elección del tratamiento para los pacientes que presenten IAAS causadas por microorganismos multirresistentes.

Existieron ligeras diferencias entre los resultados obtenidos para todas las metodologías realizadas (**ver tabla 13**), estas se remiten únicamente a casos muy particulares, lo que nos lleva a decir que todas ellas resultan confiables para la detección de cepas resistentes a los carbapenémicos, pero para lograr una caracterización sería necesario realizar todos los ensayos. A pesar de que las metodologías evalúan de manera diferente la resistencia a los carbapenémicos, se puede decir que la P12D resulta la más completa ya que esta ofrece un panorama independientemente del mecanismo involucrado (ya sea enzimático o no enzimático). Con la RT-PCR se caracterizaron 45 aislamientos

productores de carbapenemasas, 44 del tipo KPC (carbapenemasas de clase A) y uno NDM (carbapenemasa de clase B), en comparación con el THM que solo pudo detectar 42 aislamientos positivos para carbapenemasas de clase A, y el MIC que detectó únicamente 41 (**ver tabla 13**).

Tabla 13. Diferencias en los resultados de las pruebas utilizadas

DIFERENCIAS EN LA DETECCIÓN DE RESISTENCIA A CARBAPENÉMICOS		
TÉCNICA	CANTIDAD DE AISLAMIENTOS CON RESISTENCIA	AISLAMIENTOS SIN RESISTENCIA
PANEL DE IDENTIFICACIÓN Y SUSCEPTIBILIDAD (BD Phoenix 100)	53	0
P12D	52	1
THM	42	11
MIC	41	12
PCR	45	8

7.7.1 Análisis de casos

Las cepas caracterizadas con el genotipo KPC presentaron en su mayoría resistencia a los tres carbapenémicos en la P12D, y dieron resultados positivos tanto para el THM y el MIC, (**ver anexo A tablas 1 a 3**), mostrando un comportamiento similar a la **figura 46**, comprobando el alcance hidrolítico que poseen estas enzimas tomando como referencia lo reportado en diversas fuentes.

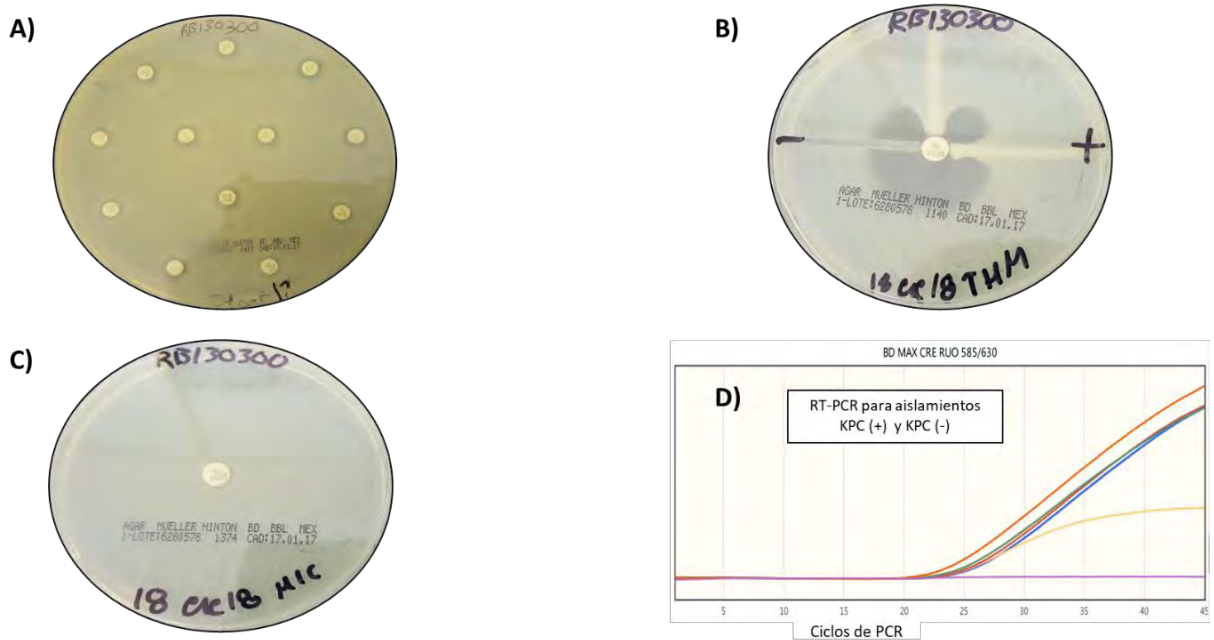


Figura 46. Caracterización de una cepa con genotipo KPC. A) Se observa una P12D sin halos de inhibición en la zona de los carbapenémicos, B) y C) Un THM y un MIC positivo, D) Curvas de amplificación de DNA en el canal para el gen *bla*_{KPC}.

En el caso de la cepa caracterizada con el genotipo NDM (ver anexo A tablas 2 y 3 aislamiento 31) se pudo observar resistencia a todos los carbapenémicos tanto en el resultado del equipo automatizado como el obtenido luego de la P12D, sin embargo la literatura reporta que las cepas con estos genes pueden llegar a presentar inhibición por aztreonam (un monobactámico incluido en la prueba de los 12 discos) situación que para esta cepa no sucedió. Así mismo el THM y el MIC resultaron negativos, lo cual puede ser resultado de que NDM es una metalobetalactamasa, la cual requiere de $Zinc^{2+}$ para realizar su función plenamente. Para el análisis de estas carbapenemasas se recomienda el uso de medios enriquecidos con sulfato de Zinc que permiten la capacidad hidrolítica de la enzima en las pruebas de difusión en agar, los resultados de una cepa NDM se pueden observar en la **figura 47**.

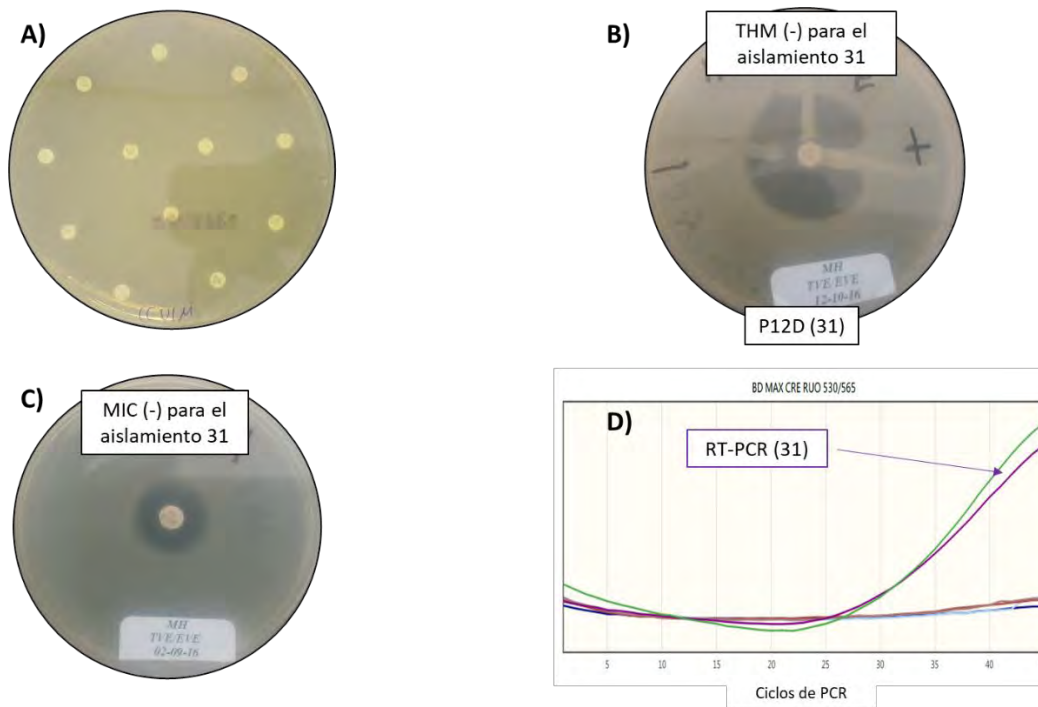


Figura 47. Caracterización de la cepa con genotipo NDM, A) Se puede observar una prueba de los 12 discos con resistencia a todos los carbapenémicos, B) y C) Una prueba del THM y el MIC negativos y D) Amplificación de DNA en el canal para el gen *bla*_{NDM}.

Luego de considerar las capacidades de detección de cada prueba se evaluaron los factores limitantes de cada técnica con la finalidad de establecer un algoritmo de detección de resistencia a los carbapenémicos para los laboratorios del ISSSTE (**tabla 14**). Dentro de los factores limitantes a considerar se encuentran los costos, la disponibilidad de los insumos para llevar a cabo las diversas metodologías y que tan capacitado esté el personal para realizar dichas técnicas.

Tabla 14. Consideraciones en la selección de las pruebas para la detección de resistencia a carbapenémicos.

Aspectos por considerar para elegir una técnica de detección de resistencia a carbapenémicos				
Técnica para determinar la resistencia	RT-PCR BD MAX®	THM	MIC	P12D
Capacidad de detección*	Excelente Aunque limitada a carbapenemasas KPC, NDM y OXA	Buena Detectando carbapenemasas de clase A	Buena Detectando carbapenemasas de clase A	Excelente detectando resistencia independientemente del mecanismo
Costo	Alto	Bajo	Bajo	Bajo
Disponibilidad de los insumos	Muy baja	Elevada	Elevada	Elevada
Requiere personal capacitado	Si	Si	No	No

Evaluando los factores a considerar para realizar las pruebas, se diseñó un posible algoritmo (**figura 48**) para la detección de enterobacterias resistentes a los carbapenémicos, el cual comienza con la identificación y pruebas de susceptibilidad del microorganismo aislado por medio del equipo automatizado presente en la unidad médica. Posteriormente si se trata de una especie de *Klebsiella* y presenta resistencia a alguno de los carbapenémicos ésta tendría que ser confirmada mediante la prueba de los 12 discos, si resulta resistente y no se dispone de equipos de biología molecular en el laboratorio, las muestras serían referidas al laboratorio de referencia donde se cuente con las pruebas complementarias (THM y RT-PCR) para caracterizar el mecanismo de resistencia del microorganismo y generar un informe final. Durante cada etapa se deberán informar al médico los resultados del aislamiento, con la finalidad de que puedan tomarse las medidas de prevención y control de la diseminación de resistencia y para que se continúe o modifique el tratamiento que está recibiendo el paciente.

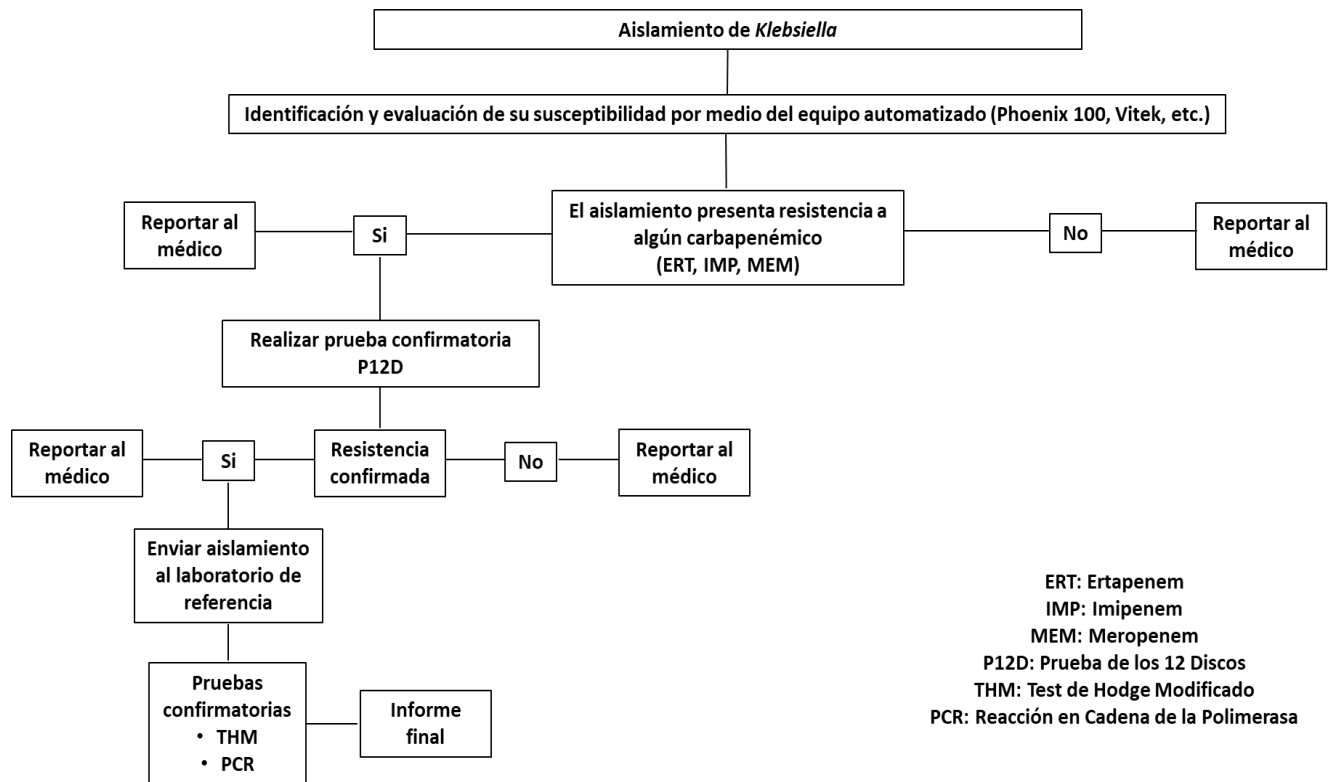


Figura 48. Propuesta de algoritmo para la detección de cepas resistentes a los carbapenémicos.

8.0 CONCLUSIONES

- Se caracterizaron 45 de los aislamientos como productores de carbapenemasas (44 KPC y uno NDM).
- Cepas de *Klebsiella* portadoras del gen *bla*_{KPC} circulan en la institución desde el año 2012.
- Se registró la presencia del gen *bla*_{NDM} en el año 2014.
- Siete de los aislamientos fueron caracterizados como *Klebsiella* Resistente a Carbapenémicos (KRC).
- Un aislamiento resultó susceptible a los carbapenémicos.
- Para determinar si una cepa es resistente a carbapenémicos es importante realizar tanto pruebas fenotípicas como genotípicas, no solamente considerar el resultado individual.
- Se propuso un algoritmo de caracterización fenotípica y genotípica de enterobacterias resistentes a carbapenémicos para los laboratorios institucionales.

9.0 PERSPECTIVAS

- Realizar la vigilancia activa (del año en curso) de las cepas con resistencia a los antibióticos en cuestión
- Evaluar otras metodologías para la detección de resistencia a los carbapenémicos, que optimicen el diagnóstico de cepas multirresistentes y permitan realizar el estudio de bacilos Gram negativos no fermentadores y fermentadores.
- Realizar capacitaciones para el personal de los laboratorios de microbiología del ISSSTE orientadas a la detección de cepas resistentes a los carbapenémicos.
- Realizar el análisis de las cepas para los años siguientes al estudio (2015, 2016, 2017).
- Evaluar la clonalidad de las cepas mediante estudios de electroforesis en gel por campo pulsado para evaluar si siguen siendo circulando las mismas clonas dentro de los hospitales.
- Estudiar el genoma de las cepas analizadas con mayor profundidad para determinar las variantes de los genes que portan dichas bacterias.

10.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Aguirre-Quiñonero A., Martínez-Martínez L., (2017), *Non-molecular detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates*, J Infect Chemother 23 (2017) 1-11.
2. Anne Marie Queenan, Wenchi Shang, Paul Schreckenberger, Karen Lolans, Karen Bush, and Quinn John, (2006), *SME-3 a novel member of the Serratia marcescens SME family of the carbapenem-hydrolyzing β -lactamases*, antimicrobial agents and chemotherapy, 50 (10) Oct. 2006, p. 3485–3487.
3. Arias-Flores R., Rosado-Quiab U., Vargas-Valerio A., Grajales-Muñiz C., (2016), *Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social*, Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2016;54(1):20-4.
4. Barrios H., Garza-Ramos U., Reyna-Flores F., Sánchez-Pérez A., Rojas-Moreno T., Garza-González E., Llaca-Díaz J., Camacho-Ortiz A., Guzmán-López, Silva-Sánchez J., (2013), *Isolation of carbapenem-resistant NDM-1 positive Providencia rettgeri in Mexico*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, (2013), doi:10.1093/jac/dkt124, 1-2.
5. Betancor L., Gadea M., Flores K., (2006), *Temas de bacteriología y virología Capítulo 4: Genética bacteriana*, Instituto de higiene universidad de la república de Uruguay, 59-79.
6. Brisse Sylvain, Grimont Francine and Grimont Patrick A. D., (2006), *The genus Klebsiella*, Prokaryotes (2006) 6:159–196.
7. Brooks G. F., Butel J. S., Morse S. A., (2005), *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*, vigésimo tercera edición, Capítulo 7: Genética microbiana, 93-117.
8. Bush K., Jacoby A. G., (2010), *Updated functional classification of β -Lactamases*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Mar. 2010, p. 969–976.
9. Calvo J., Martínez-Martínez L., (2009), *Mecanismos de acción de los antimicrobianos*, Enfer. Infecc. Microbiol. Clin. 2009, 27(1): 44-52.
10. Carrascoso G., (2016), *Tesis doctoral: Características microbiológicas y clínico-epidemiológicas de enterobacterias productoras de carbapenemasa oxa-48 en el contexto de un brote hospitalario*, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Departamento Microbiología II.
11. CDC, (2013), *Antibiotic Resistance Threats in the United States*. U. S Department Health and Human Services.

12. CLSI, (2017), *M100 Performance Standards for antimicrobial susceptibility, clinical and laboratory institute*, 27th edition, 107-127.
13. Delcour H. A., (2009), *Outer membrane permeability and antibiotic resistance*, *Biochim Biophys Acta*. 2009 May, 1794(5): 808–816.
14. Diene S. M, Rolain J. M., (2014), *Carbapenemases genes and genetic platforms in Gram negative bacilli Enterobacteriaceae, Pseudomonas y Acinetobacter species*, *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 831–838.
15. Errecalde J., (2004), *Uso de antibióticos en animales de consumo*, FAO (ONU), recuperado de <http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm> el [19/07/2017](http://www.fao.org/docrep/007/y5468s/y5468s00.htm).
16. Fernandez L., Hancock R., (2012), *Adaptative and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance*, *Clinical Microbiology Reviews* 5(4): 681-684.
17. Fresnadillo M. J., García M. I., García E., Garcia J. E., (2010), *Los carbapenems disponibles: propiedades y sus diferencias*, *Enfer. Infecc. Microbiol. Clin.* 2010, 28(Supl2): 53-64.
18. Fritsche T. R., Stilwell M. G., Jones N. R., (2005), *Antimicrobial activity of doripenem (S-4661) a global surveillance report 2003*, *Clin. Microbiol. Infect.* 2005; 11: 974-984.
19. Gobernado M., Acuña C, (2007), *Ertapenem*, *Rev. Esp. Quimioterap.* Sep. 2007, 20(3):277-299.
20. Gómez J., García-Vázquez E., Hernandez-Torres A., (2015), *Los betalactámicos en la práctica clínica*, *Rev. Esp. Quimioter.* 2015, 28(1): 1-9.
21. Hong Duck Jin, Bae Il Kwon, Jang In-Ho, Jeong Seok Hoon, Kang Hyun-Kyung, and Lee Kyungwon, (2015), *Epidemiology and Characteristics of Metallo- β Lactamase-Producing Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Chemother* 2015;47(2):81-97.
22. Kattan J. N., Villegas M. V., Quinn J. P., (2008), *New developments in carbapenems*, *Clin. Microbiol. Infect.* 2008; 14: 1102–1111.
23. Magiorakos A.-P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D. L., Rice L. B., Stelling J., Struelens M. J., Vatopoulos A., Weber J. T. and Monnet D. L., (2012), *Multi-drug resistant, extensively drug-resistant, and pandrug resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*, *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268–281.

24. Marchetti M. L., Errecalde J., Mestorino N., (2011), *Resistencia a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en la multirresistencia*, Anacleto Vet. 2011. 31(2): 40-53.
25. Marchetti M. L., Errecalde J., Mestorino N., (2011), *Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo*. Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata.
26. Marín M., Guidol F., (2003) *Antibióticos betalactámicos*, Enfer. Infecc. Microbiol. Clin. 2003, 21(1): 42-55.
27. Meletis G., (2016), *Carbapenem resistance: overview of the problem and future prospectives*, Ther Adv Infect Dis (2016), 3(1):15-21.
28. Molina-López José, sf, *Factores de patogenicidad bacteriana*, Departamento de Microbiología y Parasitología UNAM, recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html> 28 de octubre de 2017.
29. Moradigaravand D., Martin V., Peacock SJ., Parkhill J. 2017. *Evolution and epidemiology of multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae in the United Kingdom and Ireland*. mBio 8:e01976-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01976-16>.
30. Morales R., (2003), *Ertapenem una nueva clase de carbapenem*, Rev. Chi. Infect. 2003, 20(4):270-276.
31. NOM-017-SSA-2012, (2013), *Para la vigilancia epidemiológica*, Secretaria de Salud, Diario Oficial de la Federación.
32. NOM-045-SSA-2005, (2009), *Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales*, Secretaria de Salud, Diario Oficial de la Federación.
33. OMS, (2017), <http://www.who.int/drugresistance/surveillance/es/> 20 Junio de 2017.
34. OMS, (2017b), Resistencia a los antibióticos, recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/> 20 de Junio del 2017.
35. OMS, (2017c), recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/> 22 Junio de 2017.
36. OPS, (2012), *Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención de la salud*.

37. Papp-Wallace K., Endiamiani M., Toracila M. A., Bonomo R. A., (2011), *Carbapenems: Past, Present and Future*, AMS, Antimicrobial Agents And Chemotherapy, Nov. 2011, 55(11), 4943–4960.
38. Pasteran F., Corso A., Monsalvo M., Frankel, J., Lazovski J., (2015), *Resistencia a los antimicrobianos, causas, consecuencias y perspectivas en Argentina.*, recuperado de <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2015/06/Article1.pdf>, el 19/07/2017.
39. Pérez-Cano H.J, Roble-Contreras A, (2013), *Aspectos básicos de la Resistencia bacteriana*, Revista Médica 4: 188-190.
40. Podschun R., Ullmann U., (1998), *Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors*, Clinical Microbiology Reviews, Oct. 1998, p. 589–603.
41. Poirel Laurent, Potron Anaïs and Nordmann Patrice, (2012), *OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace*, J Antimicrob Chemother 2012; 67: 1597–1606.
42. Resurrección-Delgado C, Montenegro-Idrogo JJ, Chiappe-González A, Vargas-Gonzales R, Cucho-Espinoza C, Mamani-Condori DH, et al., (2017), *Klebsiella pneumoniae nueva Delhi metalo-betalactamasa en el hospital nacional Dos de Mayo*. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2017; 34(2): 261-7.
43. RHOVE, (2015), *Informe Anual 2015*.
44. Rodríguez-Zulueta P., Silva-Sánchez J., Barrios H., Reyes-Mar J., Vélez-Pérez F., Arroyo-Escalante S., Ochoa-Carrera L., Delgado-Sapien G., Morales-Espinoza M., Tamayo-Legorreta E., Hernández-Castro R., Garza-Ramos U., (2013), *First Outbreak of KPC-3-Producing Klebsiella pneumoniae (ST258) Clinical Isolates in a Mexican Medical Center*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (2013), 57(8) 4086-4088.
45. Ruppé E., Woerther P-L., Barbier F., (2015), *Mechanisms of antimicrobial in Gram-negative bacilli*, Ruppé et al. Ann. Intensive Care (2015) 5:21.
46. Schreckenberger P. C., Rekasius V., *Phenotypic Detection of β -Lactamase Resistance in Gram-Negative Bacilli: Testing and Interpretation Guide*, Loyola University Medical Center (2015), 1-13.
47. Shaikh S., Fatima J., Shakil S., Mohd S., Rizvi D., Kamal M. A., (2014), *Antibiotic resistance and extended spectrum betalactamasas: Types, epidemiology and treatment*, Saudi Journal of Biological Sciences (2015) 22, 90–101.

48. Shalley Dahiya, Pooja Singla, Uma Chaudhary, Bijender Singh, (2015), *Carbapenemases a review*, International Journal of Advanced Health Sciences 2 (4) August 2015, 11-17.
49. Suárez C., Guidol F., (2009), *Antibióticos betalactámicos*, Enfer. Infecc. Microbiol. Clin. 2009, 27(2): 116-129.
50. Thierry Naas, Laurent Dortet and Bogdan I. Iorga, (2016), *Structural and functional aspects of class A carbapenemases*, Current Drug Targets, 2016, 17, 1006-1028.
51. Torres-González P., Bobadilla-del Valle M, Tovar-Calderón E., Leal-Vega F., Hernández-Cruz A., Martínez-Gamboa A., Niembro-Ortega M., Sifuentes-Osornio J., Ponce-de-León A., (2015), *Outbreak Caused by Enterobacteriaceae Harboring NDM-1 Metallo- β -lactamase Carried in an IncFII Plasmid in a Tertiary Care Hospital in Mexico City*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (2013), 59(11) 7080-7083.
53. Torres-Manrique C., (2012), *La resistencia a los antibióticos, siete décadas después de Fleming*. Academia de Farmacia "Reino de Aragon", 13-38.
54. Van der Zwaluw K., de Haan A., Pluister GN., Bootsma HJ., de Neeling AJ., Schouls LM. (2015), *The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram- Negative Rods*. PLoS ONE 10(3): e0123690. doi:10.1371/journal.pone.0123690.
55. Van Duin D. & Doi Y., (2017), *The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*, Virulence 2017, Vol. 8, No. 4, 460–469.
56. Vignoli R., Seija V., (2008), *Temas de bacteriología y virología médica, Capítulo 35: Principales mecanismos de resistencia a antibióticos*. Instituto de higiene universidad de la república de Uruguay, página 649.
57. Walther-Rasmussen J., Høiby N., (2007), *Class A carbapenemases*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2007) 60, 470–482.
58. Warwick K., (2011), *The Joshua Lederberg Papers: profiles in science*, national library of medicine, biography, 24:4, 978-982.

11.0 ANEXOS

Anexo A: Resultados

Tabla 1. Resumen general de resultados

INFORMACIÓN GENERAL DE LOS AISLAMIENTOS				
No.	Microorganismo	Tipo de muestra	HOSPITAL	AÑO
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sin especificar*	Sin especificar*	2012
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sin especificar*	Sin especificar*	2012
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sangre	CMN "20 de Noviembre"	2013
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Herida	CMN "20 de Noviembre"	2013
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina obtenida por sonda	CMN "20 de Noviembre"	2013
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Expectoración	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2013
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Punta de catéter	CMN "20 de Noviembre"	2013
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sangre	Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos"	2013
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Úlcera	Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos"	2013
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	CMN "20 de Noviembre"	2013
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	CMN "20 de Noviembre"	2013
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lavado bronquial	CMN "20 de Noviembre"	2013
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Herida	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2013
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina obtenida por sonda	CMN "20 de Noviembre"	2013
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lavado bronquial	Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos"	2013
16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Punta de catéter	Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos"	2013
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Líquido pleural	CMN "20 de Noviembre"	2013
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sangre	Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos"	2013
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Punta de catéter	CMN "20 de Noviembre"	2013
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lavado bronquial	Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos"	2013
21	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lavado bronquial	Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos"	2014
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lavado bronquial	Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos"	2014
23	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Úlcera	CMN "20 de Noviembre"	2014
24	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Sangre	CMN "20 de Noviembre"	2014

INFORMACIÓN GENERAL DE LOS AISLAMIENTOS				
No.	Microorganismo	Tipo de muestra	HOSPITAL	AÑO
25	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	Lavado bronquial	CMN "20 de Noviembre"	2014
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Punta de catéter	CMN "20 de Noviembre"	2014
27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2014
28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2014
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Herida	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2014
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lavado bronquial	Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos"	2014
31	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Sangre	Hospital Regional "Lic. Adolfo López Mateos"	2014
32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ulcera	CMN "20 de Noviembre"	2014
33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Punta de catéter	CMN "20 de Noviembre"	2014
34	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ulcera	CMN "20 de Noviembre"	2014
35	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Líquido pleural	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2014
36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2014
37	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fístula	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2015
38	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Herida	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2015
39	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Herida	CMN "20 de Noviembre"	2015
40	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreción	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2015
41	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Herida	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2015
42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sangre	CMN "20 de Noviembre"	2015
43	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Secreción	CMN "20 de Noviembre"	2015
44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sangre	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2015
45	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sangre	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2015
46	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ulcera	CMN "20 de Noviembre"	2015
47	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina obtenida por sonda	CMN "20 de Noviembre"	2015
48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Exudado faríngeo	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2015
49	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Orina	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2015
50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Exudado faríngeo	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2015
51	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Absceso	CMN "20 de Noviembre"	2015
52	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Expectoración	Hospital General "Fernando Quiroz Gutierrez"	2015
53	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Punta de catéter	CMN "20 de Noviembre"	2015

Tabla 2. Resultados pruebas fenotipicas de susceptibilidad

No.	Microorganismo	ERT Phoenix	IMP Phoenix	MEM Phoenix	ERT 12 discos	IMP 12 discos	MEM 12 discos	THM	MIC
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S	R	S	S	R	-	-
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	I	R	R	R	+	+
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	S	S	R	-	-
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	-	-
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	-
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S	S	R	R	R	-	-
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S	S	S	S	S	-	-
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	I	R	R	R	R	+	+
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
21	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
23	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	S	S	R	R	R	-	-
24	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
25	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	R	I	I	R	R	R	+	+

No.	Microorganismo	ERT Phoenix	IMP Phoenix	MEM Phoenix	ERT 12 discos	IMP 12 discos	MEM 12 discos	THM	MIC
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	I	R	R	R	+	+
27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
31	<i>Klebsiella oxytoca</i>	R	R	R	R	R	R	-	-
32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S	S	R	S	R	-	-
34	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	I	I	R	R	R	+	+
35	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	S	R	-	-
37	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
38	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
39	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
40	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
41	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
43	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	R	S	S	R	-	-
44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
45	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
46	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	I	I	S	R	R	R	-	-
47	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
49	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
51	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
52	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+
53	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	+	+

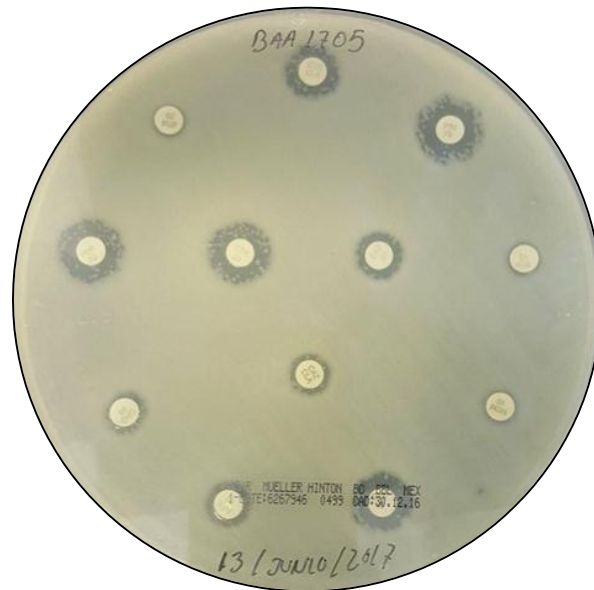
Tabla 3. Resultados PCR

No.	Microorganismo	PCR
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo
14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
21	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
23	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Negativo
24	<i>Klebsiella oxytoca</i>	KPC
25	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	KPC

No.	Microorganismo	PCR
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
28	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
30	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
31	<i>Klebsiella oxytoca</i>	NDM
32	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo
34	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
35	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo
37	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
38	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
39	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
40	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
41	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
42	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
43	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
44	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
45	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
46	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Negativo
47	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
49	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
51	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
52	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC
53	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC

Anexo B: Susceptibilidad de las cepas control de calidad.

A) Resultados para la prueba de los 12 discos de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 KPC (+), control positivo para la resistencia a los carbapenémicos.



B) Resultados para la prueba de los 12 discos de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1706 cierre de porinas como mecanismo de resistencia, control negativo para la resistencia enzimática a los carbapenémicos.



Anexo C: El banco de cepas del Laboratorio de Vigilancia Epidemiológica del ISSSTE.

Este banco de cepas cuenta con alrededor de 3000 aislamientos, obtenidos de casos asociados a IAAS entre los años 2012 y 2015, en el hay tanto microorganismos Gram positivos como negativos, siendo los últimos los de mayor cantidad. Los microorganismos en su mayoría se encuentran preservados en ultra congelación a -70 °C, pero también se pueden encontrar algunos en tubos de agar soya tripticaseína.

Existe una base de datos diseñada utilizando el programa Microsoft Excel 2010, en la cual se almacenan los datos referentes al aislamiento, como hospital de origen, servicio donde se realizó el aislamiento, tipo de muestra, especie del microorganismo, etc.

En el año 2015 comenzó a realizarse un cambio en la forma de preservar los microorganismos (de tubos con agar soya tripticaseína a ultra congelación a -70°C) y de administrar los datos los cuales se encontraban previamente en formato físico (hojas con la información del aislamiento), por lo cual se tuvieron que recuperar los documentos de cada año, encontrándose problemas para el año 2012 en el cual no se recuperó al 100% la información, para ello se tuvo que consultar el respaldo generado en la base de datos del equipo automatizado sin embargo esta no tampoco contaba con algunos de los datos referentes a los aislamientos.