



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

HOSPITAL GENERAL "DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA"
CENTRO MÉDICO NACIONAL "LA RAZA"

TESIS

FRECUENCIA DE CEPAS DEL GÉNERO *KLEBSIELLA* HIPERMUCOVISCOSA Y
SU RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO
EXTENDIDO (BLEE) EN EL HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA DEL CMN LA RAZA.
2016-2019.

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN
PATOLOGÍA CLÍNICA**

PRESENTA

DRA. GABRIELA VELÁZQUEZ ESTRADA

ASESOR

DRA. MARÍA DEL CARMEN SILVA ESCAMILLA
EVA AURORA HERNÁNDEZ SÁNCHEZ
ROSA GONZÁLEZ VÁZQUEZ

NÚMERO DE REGISTRO

R-2019-3502-1336

CIUDAD DE MÉXICO, 2019

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud 3502.
HOSPITAL GENERAL Dr. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA, CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA

Registro COFEPRIS 18 CJ 09 002 001
Registro CONBIOÉTICA CONBIOETICA 09 CEI 027 2017101

FECHA Jueves, 01 de agosto de 2019

M.E. MARIA DEL CARMEN SILVA ESCAMILLA

PRESENTE


Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **Frecuencia de cepas del género Klebsiella hiper mucoviscosa y su relación con la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en el Hospital de Infectología del CMN La Raza, 2016-2019.** que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **APROBADO**.

Número de Registro Institucional

R-2019-3502-133

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE


Dr. Guillermo Cereza Reyna
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3502

[Imprimir](#)

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

**FRECUENCIA DE CEPAS DEL GÉNERO *KLEBSIELLA* HIPERMUCOVISCOSA Y SU RELACIÓN
CON LA PRESENCIA DE BETALACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN EL
HOSPITAL DE INFECTOLOGÍA DEL CMN LA RAZA. 2016-2019.**

Dra. María Teresa Ramos Cervantes

Coordinación de Educación e Investigación en Salud

U.M.A.E. HOSPITAL GENERAL “DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA” CMN LA RAZA

Dr. Antonio Quintero Bazaldúa

Profesor Titular de la Especialidad en Patología Clínica

Jefe del Laboratorio de Patología Clínica

U.M.A.E. HOSPITAL GENERAL “DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA” CMN LA RAZA

Dra. María del Carmen Silva Escamilla

Asesor / Investigador principal

Vigilancia Epidemiológica del Hospital de Infectología

U.M.A.E. HOSPITAL GENERAL “DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA” CMN LA RAZA

Q.F.B. Eva Aurora Hernández Sánchez

Asesor / Investigador asociado

Jefe de sección de bacteriología sanitaria del Hospital de Infectología

U.M.A.E. HOSPITAL GENERAL “DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA” CMN LA RAZA

Dra. Gabriela Velázquez Estrada

Residente de 3° de la Especialidad en Patología Clínica

U.M.A.E. HOSPITAL GENERAL “DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA” CMN LA RAZA

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi gratitud a:

Mi asesora María del Carmen Silva Escamilla.

Mi coasesora Eva Aurora Hernández Sánchez.

Mi tutora Dra. en Ciencias Rosa González Vázquez.

Los estudiantes Químico Bacteriólogo Parasitólogo en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, José David García y Diana Loyola.

El jurado de evaluación Dr. Luis Alfonso Robles Espinoza, Dr. Alejandro Escamilla Gutiérrez, y Q.F.B. Gerardo Pérez Monroy.

Mis compañeros de residencia Ana Karen Luna Vargas, Andrea Flores Preciado y Edwin Samir Mendieta Bautista.

A Federico Gómez Reynoso, quien tuve la suerte de conocer en la residencia.

A los médicos, químicos y personal de laboratorio que intervinieron en mi formación académica.

El Instituto Mexicano del Seguro Social, la Universidad Nacional Autónoma de México y la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
I. RESUMEN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	13
IV. JUSTIFICACIÓN	14
V. OBJETIVOS	15
VI. HIPÓTESIS	16
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	16
VIII. RESULTADOS	26
IX. DISCUSIÓN	37
X. CONCLUSIONES	39
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
XII. ANEXOS	46

I. RESUMEN

Frecuencia de cepas del género *Klebsiella* hipermucoviscosa y su relación con la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Dra. Velázquez Estrada Gabriela, Dra. Silva Escamilla María del Carmen

La resistencia a antimicrobianos por las bacterias del género *Klebsiella* constituye un problema de interés mundial ya que resulta especialmente alarmante la rápida propagación alrededor del mundo de bacterias multirresistentes que son causa de infecciones comunes y resisten al tratamiento con los fármacos antimicrobianos existentes. Entre las bacterias *K. pneumoniae* algunas producen colonias hipermucoviscosas cuando crecen en placas de agar, y la mayoría de estas bacterias con fenotipo hipermucoviscoso son hipervirulentas, tienen la capacidad de afectar a pacientes ambulatorios sanos con la facilidad de diseminación metastásica hematogena de la infección. Aunque ha habido informes de bacterias del género *Klebsiella* hipermucoviscosa que transportan BLEE, es una ocurrencia rara; sin embargo, los casos de bacterias del género *Klebsiella* hipermucoviscosa en México que se han publicado en estos últimos cinco años se asocian con la presencia de BLEE, lo que genera inconsistencia con las investigaciones.

Objetivo: Determinar la frecuencia de cepas del género *Klebsiella* hipermucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza.

Material y Método: Estudio observacional, transversal y retrospectivo. Se realiza en cepas bacterianas del género *Klebsiella* aisladas de hemocultivos y muestras del tracto respiratorio en el Hospital de Infectología del CMN La Raza, colectadas de febrero 2016 a 2019. Se eliminan muestras con pérdida de la viabilidad bacteriana al momento de su conservación. El estudio se lleva a cabo en el laboratorio clínico del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza y se efectúa: Determinación de cepas BLEE positivas mediante el Método de Difusión en disco, Detección del tipo de BLEE por Método de PCR y Detección de hipermucoviscosidad: Prueba del Hilo, Determinación de gen *rmpA*.

Recursos e infraestructura: La tesista Gabriela Velázquez Estrada, médico residente del 2º año de Patología Clínica del Hospital General del Centro Médico Nacional La Raza, realiza todos los procedimientos bacteriológicos en el laboratorio. Se utilizan las instalaciones del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza para su estudio.

II. MARCO TEÓRICO

GÉNERO *KLEBSIELLA*

El género *Klebsiella* se compone de bacilos gramnegativos encapsulados¹ que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* e incluye seis especies: *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*), *Klebsiella granulomatis* (*K. granulomatis*), *Klebsiella variicola* (*K. variicola*), *Klebsiella singaporensis* (*K. singaporensis*) y *Klebsiella alba* (*K. alba*). Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* se caracterizan por fermentar glucosa, reducir nitrato a nitrito y la enzima citocromo c oxidasa es negativa².

El género *Klebsiella* está constituido por bacterias no móviles que se encuentran como microorganismos saprófitos en la microbiota gastrointestinal y como colonizantes en piel y nasofaringe³. También residen en el medio ambiente, por ejemplo el suelo, las aguas superficiales, e incluso en los dispositivos médicos¹.

Se debe sospechar de una especie de *Klebsiella* cuando se aíslen colonias grandes con una consistencia mucosa en las placas de aislamiento primario, por ejemplo, en agar de MacConkey, un medio sólido selectivo y diferencial de enterobacterias, donde las colonias suelen aparecer grandes y mucoides, lactosas positivas. Algunas especies de *Enterobacter spp.* pueden morfológicamente simular a las especies de *Klebsiella*, pero todas las especies de *Klebsiella* son inmóviles y no descarboxilan la ornitina, características positivas en la mayoría de especies *Enterobacter spp.*²

K. pneumoniae es indol negativa, lo que otras especies del género *Klebsiella* no lo son. Durante las últimas dos décadas surgió una nueva variante clínica de *K. pneumoniae*, que se distinguen por ser hiperproductoras de mucopolisacáridos, lo

que le confiere el fenotipo hipermucoviscoso. Las colonias hipermucoviscosas se demuestran a través de una “Prueba del hilo”, la cual es positiva cuando el asa o aguja de inoculación puede generar un hilo viscoso mayor de 5mm de longitud al tocar la colonia bacteriana y levantar el asa por encima del borde de la placa de Gelosa Sangre al 5%, creando un hilo de bacterias². En las cepas de *K. pneumoniae* que demuestran una prueba del hilo positiva se reconoce a *K. pneumoniae hipervirulenta (hvKP)*, sin embargo, no está establecido que todas las *hvKP* son hipermucoviscosas³.

La cápsula es una matriz de polisacáridos que recubre a las especies del género *Klebsiella*. Ordinariamente las cepas de *hvKP* producen una hipercápsula, es decir, una cápsula más robusta que la cápsula típica. Tanto la cápsula típica de *Klebsiella* no hipervirulenta como la hipercápsula de *hvKP* están compuestas por polisacáridos capsulares específicos de la cepa, denominados antígenos K⁴. Se han descrito 78 serotipos capsulares en *K. pneumoniae*, de los cuales K1, K2, K5, K20, K54 y K57 se han identificado como los más frecuentes, patógenos y prevalentes en las infecciones humanas causadas por este microorganismo⁵. La cápsula de polisacárido es responsable de la aparición de moco, pero no necesariamente del fenotipo hipermucoviscoso cuando el microorganismo se cultiva en diferentes medios, así los serotipos capsulares de *K. pneumoniae* pueden ser del tipo K1 a K78, sin embargo, las cepas *hvKP* se han asociado a los serotipos capsulares K1, K2, K5, K16, K20, K54, K57 y KN1⁶; las cepas *hvKP* frecuentemente pertenecen a los serotipos capsulares K1 o K2, que están capsulares que causan abscesos hepáticos y tienen mayor virulencia⁷. Diferentes investigaciones demuestran que normalmente las cepas K1 y K2 son más resistentes a la fagocitosis y la destrucción

intracelular por macrófagos y neutrófilos que las cepas con otros serotipos⁸, así una investigación reciente publicada en el año 2017, indicó que *hvKP* serotipo capsular K1 y K2 son más resistentes a la fagocitosis de neutrófilos en comparación con los serotipos K1 y K2 de cepas no hipervirulentas⁹. Otras investigaciones que explican la mayor virulencia de los serotipos capsulares K1 y K2 en relación a otras cepas que no presentan estos serotipos capsulares, se exponen en la Tabla 1.

Tabla 1. Mecanismos que generan mayor virulencia en *K. pneumoniae* con los serotipos capsulares K1 y K2 en relación a otras cepas de *K. pneumoniae* que no presentan estos serotipos capsulares

Cápsulas de los serotipos K1 y K2		
Autor	Mecanismo	Efecto
Kabha ¹⁰ Sahly ¹¹	Carecen de repeticiones específicas de residuos de manosa que son reconocidas por dos factores del huésped: el receptor de manosa en macrófagos ¹⁰ y la proteína A surfactante secretada en el pulmón (SP-A) ¹¹	Tanto la lecitina de unión a la manosa del huésped en los macrófagos, como SP-A, no reconocen al receptor de unión a manosa, impidiendo así la eliminación bacteriana mediante la activación del complemento o por opsonización ¹¹ .
Lee ⁸	Poseen un ácido siálico monosacárido específico del huésped en sus superficies, resultado del mimetismo molecular del sialoglicano de las células huésped.	Permite la evasión de respuesta inmune innata del huésped eludiendo la fagocitosis por neutrófilos.
Paczosa ¹	Inducen una liberación más pequeña de especies reactivas de oxígeno por los neutrófilos que las cepas con otros serotipos	Evita la activación fulminante de la respuesta inmune, lo que permite una mejor supervivencia en tejidos humanos
Follador ¹²	Tienen serotipos O más diversos en comparación con las cepas de otros serotipos capsulares K	Ayuda a las cepas K1 y K2 a evadir los sistemas inmunitarios del huésped.

El fenotipo de hipermucoviscosidad se asocia con el *gen regulador del fenotipo mucoide A (rmpA)*¹³, mediado por plásmidos de la síntesis del polisacárido capsular que contribuye a la resistencia en la fagocitosis de neutrófilos¹⁴. Una cepa de bacterias del género *Klebsiella* con fenotipo hipermucoviscoso puede no ser *magA* (*wzy_K*) y/o *rmpA* positiva(s) puesto que se conocen otros genes necesarios para la producción de la cápsula en las especies de las cepas del género *Klebsiella* no hipervirulentas y en *hvKP*, estos genes se ubican en un operón cromosómico (*cps*). El grupo de genes *cps* alberga una serie de genes involucrados en la producción de cápsulas¹.

Debido al aspecto hipermucoviscoso predominante en las colonias producidas por *hvKP*, se propuso que la cápsula de polisacárido es el principal factor de virulencia responsable del fenotipo hipervirulento, por lo tanto, es evidente que en algunos casos *hvKP* no se puede definir solamente con una prueba de hilo. Hay tres factores de virulencia bien caracterizados para *hvKP* además de la cápsula: lipopolisacáridos (LPS), fimbrias (tipo 1 y tipo 3) y sideróforos. Estos tres factores de virulencia además de estar presentes en *hvKP* también se encuentran en las especies de las cepas del género *Klebsiella*¹. Los LPS son una parte integral de la membrana externa. Las fimbrias tipo 1 y tipo 3 son estructuras adhesivas unidas a la membrana y secretan sideróforos que capturan el hierro. De los sideróforos, la enterobactina se produce en casi todas las cepas del género *Klebsiella* no hipervirulentas e hipervirulentas, y la yersiniabactina se produce en aproximadamente la mitad de las cepas del género *Klebsiella* no hipervirulentas pero en casi todas las cepas de *hvKP*¹. La salmochelina y la aerobactina son sideróforos rara vez producidos por

cepas del género *Klebsiella* no hipervirulentas, pero típicamente son segregados por cepas *hvKP*¹.

BETALACTAMASAS

Las betalactamasas son enzimas bacterianas que promueven la degradación del anillo betalactámico de los antibióticos betalactámicos cuando cortan el enlace amida en la estructura del anillo betalactámico de cuatro átomos, inactivando los antibióticos betalactámicos y por consiguiente impidiendo su actividad contra las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular bacteriana¹⁵. Las BLEE fenotípicamente se caracterizan por inactivar penicilinas y cefalosporinas; pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otros inhibidores de betalactamasas como el tazobactam y el sulbactam, estos compuestos se asemejan a los antibióticos betalactámicos y pueden unirse a la betalactamasa de manera reversible o irreversible, protegiendo al antibiótico de la destrucción².

El esquema de Ambler clasifica las enzimas bacterianas betalactamasas basado en la estructura molecular. La pauta general de este esquema consta de tres distintas clases de enzimas: cefalosporinasas, serin betalactamasas y metalobetalactamasas².

A la clase A de Ambler pertenecen enzimas con 265 a 269 residuos de aminoácidos, de masas moleculares entre 25 y 32 kilo Dalton, betalactamasas con un residuo de serina en su sitio activo que las hace serin betalactamasas¹⁶. Las serin betalactamasas son el grupo más grande betalactamasas, e hidrolizan carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y aztreonam. Se inhiben por ácido clavulánico y por ácido fenilborónico². En este grupo se encuentran las enzimas

sulfhidrido variable (SHV) y cefotaximasa (CTX-M), ambas con sus diferentes variables.

La primera BLEE, conocida como SHV-2, se descubrió en Alemania en el año de 1983, y fue descrita en una cepa de *Klebsiella ozaenae* (*K. ozaenae*)^{17, 18}. Las BLEE tipo SHV surgen debido a mutaciones en betalactamasas codificadas por el gen *bla SHV*¹⁹. Actualmente se han reportado más de 140 variantes para SHV¹⁷.

En 1989 se detectó un aislado clínico de *Escherichia coli* (*E. coli*) con una enzima diferente a SHV, que se denominó CTX-M-1 por su actividad hidrolítica preferente por cefotaxima¹⁸. Las enzimas del tipo CTX-M se han aislado en casi todas las enterobacterias, particularmente en *K. pneumoniae*, *E. coli* y *Enterobacter*¹⁸. Estas enzimas son codificadas por el gen *bla CTX-M*¹. Se conocen más de 80 variantes de CTX-M, clasificadas en distintos grupos como CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 y CTX-M-25, y la cifra sigue creciendo¹⁹.

Tabla 2. Identificación por primera vez de BLEE tipo SHV y CTX-M en distintas cepas, gen de codificación, clasificación según Ambler y variantes

BLEE	Año de identificación	Microorganismo en que se identificó	Gen de codificación	Clasificación de Ambler	Variante
SHV	1983	<i>K. ozaenae</i>	<i>bla SHV</i>	Clase A	Más de 140
CTX	1989	<i>E. coli</i>	<i>bla CTX-M</i>	Clase A	Más de 80

Durante las últimas dos décadas se han identificado bacterias del género *Klebsiella* hipervirulentas e hipervirulentas productoras de BLEE tipo SHV y CTX-M en distintas cepas patógenas alrededor del mundo (Tabla 3).

EPIDEMIOLOGÍA

A mediados de la década de 1980 investigadores en Taiwán notaron por primera vez, en individuos que a menudo eran diabéticos pero no tenían un trastorno del tracto biliar, un síndrome distintivo de absceso hepático piogénico monomicrobiano de *K. pneumoniae* con la capacidad de producir colonias hipermucoviscosas cuando crecen en placas de agar, denominada *hvKP* por su capacidad de afectar a pacientes ambulatorios sanos con la facilidad de diseminación metastásica hematogena de la infección y su probable fenotipo de hipermucoviscosidad ⁶. Lo mismo ocurrió en posteriores informes provenientes de países en la costa asiática del Pacífico (Corea, Vietnam y Japón)². Subsecuentemente, un número cada vez mayor de casos se han informado en Norteamérica, Sudamérica, el Caribe y en otros continentes⁶. En el año 2013 Carrillo Esper publicó el primer caso de un síndrome clínico asociado a infección por *hvKP* en México, siendo el agente causal BLEE positivo con fenotipo hipermucoviscoso²². Las cepas *hvKP* frecuentemente pertenecen a los serotipos capsulares K1 o K2, estos serotipos son los más patógenos para los humanos y entre ellos, el serotipo K1 es predominante en Asia, y el serotipo K2 se ha aislado más frecuentemente en América y Europa⁶. Así mismo, en un estudio realizado en México por Garza y colaboradores, que fue publicado en el año 2018, se reporta que en el Hospital General de Acapulco se aisló en el año 2013 el serotipo capsular K2 y K5 en el líquido cefalorraquídeo y esputo de dos aislados con *hvKP* ²³.

Según el Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (GLASS, por sus siglas en inglés) resulta especialmente alarmante la rápida propagación a nivel mundial de bacterias multirresistentes que son causa de

infecciones comunes y resisten al tratamiento con los fármacos antimicrobianos existentes. En octubre de 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) puso en marcha el GLASS para la obtención, análisis e intercambio entre países de datos normalizados, comparables y validados sobre la resistencia a los antimicrobianos; combinando los datos de los pacientes con los de laboratorio y los de vigilancia epidemiológica para la comprensión del alcance y los efectos en las poblaciones de la resistencia a los antimicrobianos. En el año 2018 la OMS publicó el primer informe del GLASS y, debido a los resultados del mismo, reiteró su advertencia de los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. El informe reveló la presencia generalizada de resistencia a los antibióticos en muestras de 500 000 personas de 22 países en las que se sospechaban infecciones bacterianas. Entre las bacterias resistentes más frecuentes que se hallaron, *K. pneumoniae* ocupa el segundo lugar, después de *E. coli*²⁴.

En cuanto a hvKP, los primeros casos mostraron un fenotipo de susceptibilidad a varias clases de antimicrobianos²⁴, pero de manera preocupante, últimamente se han descrito cepas hvKP hipermucoviscosas resistentes a múltiples fármacos que albergan BLEE, así por ejemplo en México se ha reportado en la bibliografía al menos dos casos en esta última década^{23, 25}.

Entre *K. pneumoniae* y hvKP la resistencia a los antibióticos es un fenómeno asociado principalmente con *K. pneumoniae*, ya que aunque ha habido informes de cepas hvKP que transportan BLEE, es una ocurrencia rara⁴, sin embargo, como se muestra en la Tabla 3, en México se han publicado casos en estos últimos cinco años.

Tabla 3. Bacterias del género *Klebsiella* no hipervirulentas e hipervirulentas productoras de BLEE tipo SHV y CTX-M en distintas cepas patógenas alrededor del mundo durante las últimas dos décadas

Autor	Año de aislamiento	Año de publicación	Lugar del brote	País	Tipo de BLEE	Bacteria	Fenotipo hiper mucoviscoso
Paskova ²⁶	2016	2018	Entornos hospitalarios	República Checa	SHV-12 CTX-M-15	<i>K. pneumoniae</i>	No
Dehshiri ²⁷	2014-2015	2018	Infecciones nosocomiales	Irán	SHV-1 CTX-M-1 CTX-M-2 CTX-M-3	<i>K. pneumoniae</i>	No
Aquino ²⁸	2013-2015	2018	Instituto Nacional de Pediatría	México	SHV-12 SHV-1	<i>K. pneumoniae</i>	No
Garza ²³	2013-2014	2018	Clínica ISSSTE de Chilpancingo	México	CTX-M-15	<i>HvKP</i>	Sí
Enas ²⁹	2002-2003	2013	Infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad	Egipto	SHV-5, SHV-2a, SHV-12	<i>K. pneumoniae</i>	No
Campos ³⁰	No especifica	2018	No especifica	Brasil	SHV-11	<i>HvKP</i>	Sí
Xu ³¹	No especifica	2018	Adquirido en la comunidad	China	CTX-M-14	<i>hvKP</i>	Sí
Paraschiv ³²	No especifica	2018	Adquirido en la comunidad	Rumania	No especifica	<i>hvKP</i>	Sí
Lee ³³	No especifica	2018	Adquirido en la comunidad	EEUU (hombre originario de El Salvador, residente de EEUU hace 5 años)	No especifica	<i>hvKP</i>	Sí
Maheswaranathan ³⁴	No especifica	2018	Adquirido en la comunidad	EEUU (mujer originaria de China, residente de EEUU hace 30 años)	No especifica	<i>hvKP</i>	Sí
Carrillo ²⁵	No especifica	2013	Adquirido en la comunidad	México	CTX-M-15	<i>HvKP</i>	Sí

ASOCIACIÓN CLÍNICA

Dentro del género *Klebsiella*, la especie *K. pneumoniae* está disponible en el tracto gastrointestinal, ocular, respiratorio y urogenital de humanos sanos. Existe como microorganismo saprófito en la nasofaringe de algunos de individuos. Las infecciones son menos comunes fuera de los hospitales, y las rutas de transmisión suelen ser las manos del personal del hospital, soluciones antisépticas, contenedores de trabajo y equipos de trabajo. Los instrumentos de anestesia y respiración artificial son el mejor medio de transporte de infecciones debido a la humedad. En general *K. pneumoniae* causa neumonía adquirida nosocomial, infección del tracto urinario o bacteriemia; los pacientes de más de 40 años de edad con síndromes de inmunodeficiencia y afecciones médicas subyacentes como neoplasia maligna, diabetes mellitus y enfermedad pulmonar crónica son el objetivo de esta bacteria⁵.

Las infecciones por *hvKP* adquiridas en la comunidad se asocian a un síndrome clínico que se presentan con abscesos hepáticos piógenos con propensión a la diseminación metastásica hematógena a sitios distantes², los pacientes rara vez tienen una enfermedad hepatobiliar antes de la infección, antecedentes de cirugía hepatobiliar, antecedentes de traumatismo o cirugía intraabdominal, ni neoplasia maligna; las manifestaciones clínicas más frecuentes en pacientes con abscesos hepáticos por *hvKP* son fiebre, escalofríos y dolor abdominal; la leucocitosis, la trombocitopenia, el aumento de las concentraciones de proteína C reactiva y la glucosa en sangre, y los resultados anormales de las pruebas de función hepática son comunes en los abscesos hepáticos piógenos secundarios a infección por *hvKP*⁵. Las cepas de *hvKP* se relacionan con la capacidad de causar infecciones en pacientes ambulatorios sanos, sitios inusuales de infección (por ejemplo hígado, ojo

o líquido cefalorraquídeo) y capacidad para diseminarse de forma hematológica metastásica. Es así que *hvKP* causa infecciones graves como absceso hepático piógeno, endoftalmitis, meningitis, miositis, osteomielitis y fascitis necrotizante en individuos sanos y ambulatorios. Por las características clínicas únicas y graves de estas cepas los laboratorios deben considerar informar las cepas de *K. pneumoniae* que demuestren una prueba del hilo positiva como *hvKP* pues el protocolo de diagnóstico diferencial de los abscesos hepáticos debe tener en cuenta esta entidad²².

Las diferencias clínicas expuestas entre *K. pneumoniae* y *hvKP* se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Diferencias clínicas entre *K. pneumoniae* y *hvKP*

Parámetro	<i>K. pneumoniae</i>	<i>HvKP</i>
Tipos comunes de infección	Neumonía adquirida nosocomial, infección del tracto urinario, bacteriemia	Absceso hepático piógeno, endoftalmitis, meningitis, miositis, osteomielitis, fascitis necrotizante
Población susceptible	Pacientes de más de 40 años de edad con síndromes de inmunodeficiencia y afecciones médicas subyacentes como neoplasia maligna, diabetes mellitus y enfermedad pulmonar crónica	Pacientes ambulatorios sanos
Tipo de infección primaria adquirida	Nosocomial	Adquirida en la comunidad

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque no hay datos estadísticos concretos, en la actualidad se conoce que entre las bacterias del género *Klebsiella* no hipermucoviscosa e hipermucoviscosa la resistencia a los antibióticos es un fenómeno asociado principalmente con microorganismos del género *Klebsiella* no hipermucoviscosa, ya que si bien ha habido informes de bacterias del género *Klebsiella* hipermucoviscosa que transportan BLEE, es una ocurrencia rara; sin embargo, los casos de bacterias del género *Klebsiella* hipermucoviscosa en México que se han publicado en estos últimos cinco años se asocian con la presencia de BLEE, lo que genera inconsistencia con las investigaciones, por lo cual en esta investigación se pretende responder la siguiente interrogante:

¿Cuál es la frecuencia de cepas del género *Klebsiella* hipermucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza?

IV. JUSTIFICACIÓN

Los más recientes informes indican la importancia a nivel mundial de las bacterias del género *Klebsiella* en el grupo de microorganismos multirresistentes a antimicrobianos causantes de infecciones bacterianas, entre las bacterias *K. pneumoniae* destacan las hipermucoviscosas por ser en su gran mayoría hipervirulentas. El impacto de esta investigación es aportar información sobre la frecuencia de cepas del género *Klebsiella* hipermucoviscosas BLEE positivas, ya que aunque las bacterias del género *Klebsiella* hipermucoviscosa que transportan BLEE es una ocurrencia rara, los casos de bacterias del género *Klebsiella* hipermucoviscosa en México que se han publicado en estos últimos cinco años se asocian con la presencia de BLEE.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar la frecuencia de cepas del género *Klebsiella* hipermucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Encontrar la relación entre la identificación de bacterias del género *Klebsiella* con la detección de hipermucoviscosidad en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.
- Encontrar la relación entre la identificación de bacterias del género *Klebsiella* no hipermucoviscosa e hipermucoviscosa con la detección del gen *mpA* en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.
- Identificar bacterias del género *Klebsiella* no hipermucoviscosa e hipermucoviscosa BLEE positivas tipo SHV y CTX en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

VI. HIPÓTESIS

La Identificación de bacterias del género *Klebsiella* no hipermucoviscosa se relaciona con mayor frecuencia a la presencia de BLEE y genotipo *rmpA* negativo; así como la Identificación de bacterias del género *Klebsiella* hipermucoviscosa se relaciona con mayor frecuencia a la ausencia de BLEE y genotipo *rmpA* positivo.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO

Estudio observacional, transversal y retrospectivo.

POBLACIÓN

Población de estudio: cepas bacterianas del género *Klebsiella* aisladas de hemocultivos y muestras del tracto respiratorio en el Hospital de Infectología del CMN La Raza.

CRITERIO DE SELECCIÓN DE MUESTRAS

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Cepas bacterianas del género *Klebsiella* aisladas de hemocultivos y muestras del tracto respiratorio en el Hospital de Infectología del CMN La Raza.

CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN

Criterio de eliminación: pérdida de la viabilidad bacteriana al momento de su conservación.

UBICACIÓN ESPACIO TEMPORAL

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio clínico del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional La Raza, en cepas del género *Klebsiella* aisladas de hemocultivos y muestras del tracto respiratorio, colectados durante el periodo comprendido de febrero 2016 a febrero 2019

DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES

Tabla 5. Definición de las variables

VARIABLE	DEFINICIÓN	INFLUENCIA	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADOR	OPERACIONALIZACIÓN
Cepas de <i>Klebsiella</i> con fenotipo hipermucoviscoso	Colonias del género <i>Klebsiella</i> que generan un hilo viscoso de gran longitud.	Dependiente	Cualitativa	Nominal	Sí No	Prueba del hilo Sí: >5mm de longitud No: <5mm de longitud
Cepas de <i>Klebsiella</i> con producción de BLEE	Colonias del género <i>Klebsiella</i> productoras de enzimas bacterianas que degradan el anillo betalactámico de antibióticos betalactámicos.	Independiente	Cualitativa	Nominal	Positivo Negativo	Método de difusión en disco Positivo: ≥5mm del halo de inhibición Negativo: ≤5mm del halo de inhibición
Cepas de <i>Klebsiella</i> con expresión del gen <i>rmpA</i>	Colonias del género <i>Klebsiella</i> que expresan el gen regulador del fenotipo mucoide A, denominado <i>rmpA</i>	Independiente	Cualitativa	Nominal	Positivo Negativo	PCR Positivo: <i>rmpA</i> detectado Negativo: <i>rmpA</i> no detectado

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizó en el Hospital de Infectología del CMN La Raza del IMSS, en la Ciudad de México D.F. por la tesista Gabriela Velázquez Estrada, médico residente de Patología Clínica, bajo la colaboración, supervisión y apoyo de los asesores comentados previamente.

Después de la autorización del proyecto de investigación por el Comité Local de Investigación (CLIEIS), se procedió a la realización del proyecto de investigación.

Se trabajó con el expediente clínico y se analizaron las cepas bacterianas del género *Klebsiella* que fueron aisladas de pacientes que estuvieron hospitalizados en la unidad médica durante el periodo de febrero 2016 a 2019.

La manera en que se trabajó con los métodos microbiológicos en el laboratorio clínico del HICMN La Raza, se describe a continuación:

MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

1. Recepción de hemocultivos y muestras del tracto respiratorio positivos.
2. Aislamiento de bacilos gramnegativos y oxidasa negativo.
3. Identificación y susceptibilidad de *Klebsiella* por el sistema automatizado Vitek 2.
4. Conservación de cepas.
5. Activación de cepas.
6. Purificación de cepas.
7. Determinación de cepas BLEE positivas mediante el Método de Difusión en disco.
8. Detección del tipo de BLEE por Método de PCR.
9. Detección de hipermucoviscosidad.
 - 9.1 Prueba del Hilo.
 - 9.2 Determinación de gen *rmpA*.
10. Clasificación de las cepas
Determinación de cepas del género *Klebsiella* no hipermucoviscosa o hipermucoviscosa, BLEE positivas o negativas.

DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

1.- Recepción de hemocultivos y muestras del tracto respiratorio positivos.

En el laboratorio de Bacteriología, se llevó a cabo la recepción de hemocultivos y muestras del tracto respiratorio positivos, se recabaron los datos de los pacientes y de la muestra.

2.- Aislamiento de bacilos Gramnegativos y oxidasa negativos.

El aislamiento de bacilos Gramnegativos, oxidasa negativos, requirió el siguiente procedimiento:

- Del hemocultivo o la muestra del tracto respiratorio se sembró en caldo cerebro-corazón (BHI "Brain Heart Infusión") e incubó por 24 a 28h, de 35 a 37°C
- A partir del crecimiento en caldo, con hisopo estéril se quitó el excedente del caldo en las paredes del tubo y posteriormente se improntó en placas de gelosa sangre de carnero al 5% y el medio cromogénico CPS y con asa bacteriológica se sembró por estría cruzada. Se incubó por 24 a 48 horas, a una temperatura de 35 a 37°C y atmósfera de aerobiosis.
- Se revisó la pureza de la cepa.
- Se realizó tinción Gram, prueba de oxidasa y catalasa.

3.- Identificación y susceptibilidad de *Klebsiella* por el sistema automatizado Vitek2

De los cultivos puros de 24hrs de cepas identificadas como bacilos Gramnegativos, oxidasa negativos, se realizó una suspensión en solución salina estéril al 0.45% a

una concentración de 0.5 del nefelómetro de McFarland para efectuar pruebas de identificación y de susceptibilidad con el equipo Vitek 2 ® Biomerieux utilizando tarjetas de identificación GN y de sensibilidad AST-GN286.

Las cepas identificadas del género *Klebsiella* procedieron a métodos de conservación.

4.- Conservación de Cepas

Los cultivos puros de 24hrs de *Klebsiella* se conservaron. Cuatro tubos Eppendorf, 2 con 1mL de caldo soya tripticaseína (TSA) con glicerol al 5% y 2 con 1mL de caldo BHI con glicerol al 5% se emplearon para conservación en congelación a -20° , tomando un asa cargada de cultivo para cada tubo.

5.- Activación de Cepas

De las cepas congeladas a -20°C se tomó con hisopo estéril y resembró en caldo BHI de 24 a 48 hrs de 35 a 37°C .

Se observó turbidez y resembró en gelosa sangre de carnero al 5%.

Se incubó 24 a 48hrs de 35 a 37°C , en aerobiosis.

6.- Purificación de Cepas

En caso de contaminarse la cepa durante el proceso de conservación, una vez activada la cepa, se seleccionaron colonias puras de *Klebsiella* y resembraron en gelosa sangre de carnero al 5% y agar Mac Conkey para incubar 24 de 35 a 37°C , en aerobiosis.

7.- Determinación de cepas BLEE positivas por Método de Difusión en disco

La determinación de BLEE se realizó mediante la prueba de susceptibilidad a ceftazidima 30µg y ceftazidima - ácido clavulánico 30µg/10µg o cefotaxima 30µg y cefotaxima- ácido clavulánico 30µg/10µg mediante método de difusión en agar, en donde se interpretó según los criterios establecidos en las guías del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) 2019.

El método de difusión en agar consistió en:

- Selección de 1 a 2 colonias, inoculación en tubos con 3 mL de caldo Mueller Hinton (MH) hasta ajustar al 0.5 del Nefelómetro de McFarland.
- Siembra masiva con hisopos estériles en placas de MH.
- Absorción del inóculo por 60 seg aproximadamente.
- Colocación de los sensidiscos de ceftazidima (30 µg).
- Incubación de las placas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16 a 18 horas.
- Entre 16 a 18h de incubación se realizó la lectura de los halos de inhibición.
- El diámetro de los halos de inhibición (mm) de cada aislamiento se comparó con los criterios establecidos (CLSI, 2019) para determinar la resistencia (R) o susceptibilidad (S) a los antibióticos.
- El resultado se interpretó como negativo cuando formó un halo \leq a 5mm de diámetro o positivo cuando el halo fue \geq a 5mm de diámetro.

8.- Detección del tipo de BLEE por PCR

La extracción del DNA se realizó por el método de Tiocianato de Guanidina. El DNA se visualizó para apreciar la integridad a través de electroforesis de agarosa y como revelador se utilizó bromuro de etidio.

- Amplificación de genes de resistencia:
 - Se usaron oligonucleótidos para amplificación de genes de resistencia.
 - El Programa de amplificación consistió en:
 - Desnaturalización inicial: 95 °C por 5 min; 35 ciclos:
 - Desnaturalización: 95°C por 30 segundos.
 - Alineamiento 30 segundos.
 - Terminación: 72 °C por 1 minuto.

Tabla 6. Amplificación de genes de resistencia

Gen	Secuencia 3'-5' de oligonucleótidos	Temperatura de fusión de oligonucleótidos (Tm)
<i>CTX-M</i>	Forward: ATG TGC AGT ACC AGT AAA GTT ATG GC Reverso: ACC GCG ATA TCG TTG GT	56°C
<i>SHV</i>	Foward: GGTTATGCGTTATATTCGCC Reverso: TTA GCG TTG CCA GTG CTC	58°C

- Extensión final: 72 °C por 2 minutos.

9. Determinación de la hipermucoviscosidad mediante la Prueba del hilo y PCR.

9.1 Prueba del hilo.

Las colonias hipermucoviscosas son aquellas que en una “prueba del hilo” se genera un hilo viscoso mayor de 5mm de longitud al tocar la colonia bacteriana con el asa o aguja de inoculación y levantarla por encima del borde de la placa de agar Gelosa Sangre, creando un hilo de bacterias.

9.2 PCR

- Amplificación del gen *rmpA*
 - El Programa de amplificación consistió en:
 - Desnaturalización inicial: 95 °C por 5 min; 35 ciclos:
 - Desnaturalización: 95°C por 30 seg
 - Alineamiento 1min
 - Terminación: 72 °C por 1 min

Tabla 6. Amplificación del gen *rmpA*

Gen	Secuencia 3'-5' de oligonucleótidos	Tm
<i>rmpA</i>	Forward: ACTGGGCTACCTCTGCTTCA Reverso: CTTGCATGAGCCATCTTTCA	52°C

- Extensión final: 72 °C por 2 min

10. Clasificación de las cepas

Determinación de cepas del género *Klebsiella* no hipermucoviscosa o hipermucoviscosa, BLEE positivas o negativas.

ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo con el reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la salud, título Segundo de los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, Capítulo I, Disposiciones comunes, artículo 17, esta investigación es catalogada como **Sin Riesgo**. A continuación, se ilustra dicha categoría.

- I. Investigación **Sin Riesgo**: Estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental retrospectivos, no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada en las variables fisiológicas, psicológicas y sociales **de los individuos que participan en el estudio**, entre los que se considera: cuestionario, entrevistas, revisión de expedientes clínicos y otros, en los que no se identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta.

Acorde con lo establecido en la Ley Federal de Protección de Datos Personales.

Por lo anterior, no se requiere consentimiento informado por escrito, debido a que se trabajará con el expediente clínico y los resultados de estudios (cepas bacterianas) de laboratorio de pacientes previamente hospitalizados en la unidad médica.

No existen implicaciones éticas para este estudio ya que **no se requerirá interacción directa con el paciente, ni con el proceso de recolección de las muestras.**

De la misma forma, tampoco se contrapone a los lineamientos establecidos la declaración de Helsinki.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La recopilación de la información, así como la revisión y codificación es responsabilidad del investigador, esto con la finalidad de disminuir la variabilidad y lograr un mejor control sobre la calidad de los datos. Se codificaron las preguntas, captura y análisis de datos utilizando el paquete estadístico SPSS versión 18. Todas las variables y sus indicadores son incluidos. Una vez codificadas las variables y construída la base de datos se realizó el siguiente análisis: se consideraron las variables cualitativas y se expresaron como frecuencias absolutas y relativas, así como prevalencias puntuales con intervalos de confianza al 95%.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

No se requiere consentimiento informado, dado el tipo de investigación, así como el grado de riesgo.

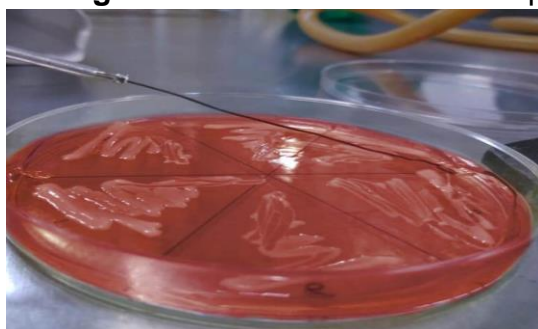
VIII. RESULTADOS

Tabla 7. Cepas de *Klebsiella* con fenotipo hiper mucoviscoso

.Cepas de <i>Klebsiella</i> con fenotipo hiper mucoviscoso		
Número de cepa	Prueba del hilo	Hiper mucoviscosa
4	< 5mm de longitud	No
7	< 5mm de longitud	No
8	< 5mm de longitud	No
11	< 5mm de longitud	No
13	< 5mm de longitud	No
14	< 5mm de longitud	No
15	< 5mm de longitud	No
20	< 5mm de longitud	No
21	< 5mm de longitud	No
22	< 5mm de longitud	No
23	< 5mm de longitud	No
27	< 5mm de longitud	No
29	< 5mm de longitud	No
30	< 5mm de longitud	No
32	< 5mm de longitud	No
33	< 5mm de longitud	No
34	< 5mm de longitud	No
35	< 5mm de longitud	No
36	< 5mm de longitud	No
37	< 5mm de longitud	No
38	< 5mm de longitud	No
39	< 5mm de longitud	No
40	< 5mm de longitud	No
41	< 5mm de longitud	No
42	> 5mm de longitud	Sí
43	< 5mm de longitud	No
45	< 5mm de longitud	No
46	< 5mm de longitud	No
16535	< 5mm de longitud	No
16672	< 5mm de longitud	No

Nota: la cepa número 42 es la única que expresa el fenotipo de hiper mucoviscosidad.

Imagen 1. Prueba del hilo de la cepa número 42 con fenotipo hiper mucoviscoso



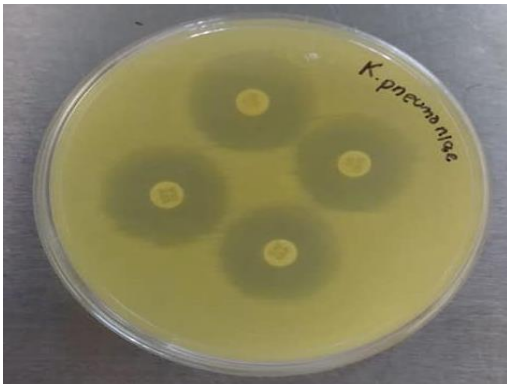
Nota: el asa de inoculación genera un hilo viscoso mayor de 5mm de longitud al tocar la colonia bacteriana y levantar el asa por encima del borde de la placa de Gelosa Sangre al 5%, creando un hilo de bacterias.

Tabla 8. Cepas de *Klebsiella* con producción de BLEE

Cepas de <i>Klebsiella</i> con producción de BLEE					
Número de cepa	Método de difusión en disco				BLEE
	Ceftazidima 30µg	Ceftazidima y ácido clavulánico 30µg/10µg	Cefotaxima 30µg	Cefotaxima y ácido clavulánico 30µg/10µg	
4	15 mm	21 mm	<5 mm	18 mm	Sí
7	17 mm	23 mm	8 mm	19 mm	Sí
8	17 mm	23 mm	9 mm	16 mm	Sí
11	9 mm	22 mm	11 mm	12 mm	Sí
13	13 mm	20 mm	8 mm	12 mm	Sí
14	8 mm	21 mm	9 mm	18 mm	Sí
15	16 mm	23 mm	9 mm	12 mm	Sí
20	12 mm	23 mm	<5 mm	18 mm	Sí
21	11 mm	21 mm	<5 mm	19 mm	Sí
22	18 mm	24 mm	<5 mm	12 mm	Sí
23	13 mm	23 mm	<5 mm	9 mm	Sí
27	16 mm	23 mm	14 mm	15 mm	Sí
29	18 mm	23 mm	10 mm	12 mm	Sí
30	14 mm	22 mm	<5 mm	10 mm	Sí
32	9 mm	18 mm	SR	SR	Sí
33	14 mm	19 mm	<5 mm	18 mm	Sí
34	11 mm	20 mm	<5 mm	17 mm	Sí
35	15 mm	22 mm	7 mm	11 mm	Sí
36	15 mm	21 mm	10 mm	18 mm	Sí
37	16 mm	22 mm	<5 mm	20 mm	Sí
38	13 mm	19 mm	<5 mm	18 mm	Sí
39	14 mm	21 mm	<5 mm	19 mm	Sí
40	11 mm	22 mm	<5 mm	7 mm	Sí
41	15 mm	22 mm	<5 mm	10 mm	Sí
42	22 mm	23 mm	SR	SR	No
43	<5 mm	22 mm	<5 mm	11 mm	Sí
45	SR	SR	<5 mm	20 mm	Sí
46	14 mm	23 mm	<5 mm	11 mm	Sí
16535	<5 mm	10 mm	SR	SR	Sí
16672	<5 mm	11 mm	SR	SR	Sí

Nota: SR, Sin resultado. La cepa número 42 es la única que no produce BLEE.

Imagen 2. Método de difusión en disco de la cepa número 11 con producción de BLEE.



Nota: el diámetro de los halos de inhibición (mm) de la cepa 11 se comparó con los criterios CLSI, 2019, para determinar susceptibilidad a los antibióticos.

Tabla 9. Cepas de *Klebsiella* con expresión del gen BLEE tipo *SHV* y/o *CTM-X*.

Cepas de <i>Klebsiella</i> con expresión del gen BLEE tipo <i>SHV</i> y/o <i>CTM-X</i>		
Número de cepa	Gen BLEE tipo <i>SHV</i>	Gen BLEE tipo <i>CTX-M</i>
4	Sí	No
7	No	No
8	Sí	Sí
11	Sí	Sí
13	Sí	No
14	Sí	No
15	Sí	No
20	Sí	No
21	Sí	Sí
22	Sí	Sí
23	Sí	No
27	Sí	No
29	Sí	Sí
30	Sí	Sí
32	No	Sí
33	Sí	No
34	No	No
35	Sí	No
36	No	No
37	Sí	No
38	No	No
39	No	No
40	Sí	Sí
41	Sí	Sí
42	No	No
43	Sí	No
45	No	No

46	Sí	No
16535	No	Sí
16672	No	Sí

Nota: la determinación de la expresión del gen BLEE tipo *SHV* y/o *CTM-X* se realizó mediante PCR.

Imagen 3. PCR del gen *SHV* en cepas del género *Klebsiella*



Nota: M, marcador. CP, control positivo. CN, control negativo. Los números representan la cepa analizada.

Imagen 4. PCR del gen *CTM-X* en cepas del género *Klebsiella*



Nota: M, marcador. Los números representan la cepa analizada.

Tabla 10. Cepas de *Klebsiella* con expresión del gen *rmpA*.

Cepas de <i>Klebsiella</i> con expresión del gen <i>rmpA</i>	
Número de cepa	Gen BLEE tipo <i>rmpA</i>
4	SR
7	SR
8	SR
11	SR
13	SR
14	SR
15	SR
20	SR
21	SR
22	SR
23	SR
27	SR
29	SR
30	SR
32	SR

33	SR
34	SR
35	SR
36	SR
37	SR
38	SR
39	SR
40	SR
41	SR
42	SR
43	SR
45	SR
46	SR
16535	SR
16672	SR

Nota: SR, sin resultado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

Tabla 11. Frecuencias absolutas y relativas de cepas del género *Klebsiella* hipermucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Frecuencia de cepas del género <i>Klebsiella</i> hipermucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.		
	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
Cepas hipermucoviscosas BLEE positivas	0	0
Cepas hipermucoviscosas BLEE negativas	1	1

Figura 1. Frecuencias absolutas y relativas de cepas del género *Klebsiella* hipermucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

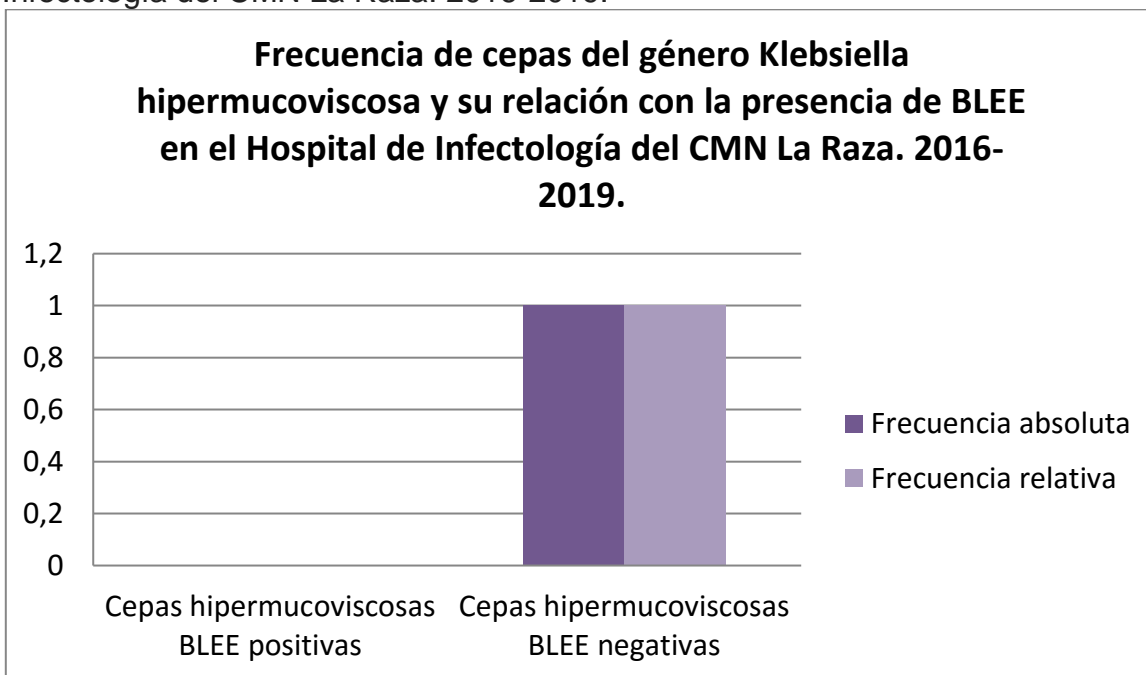


Tabla 14. Relación entre la identificación de bacterias del género *Klebsiella* con la detección de hipermucoviscosidad en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Relación entre la identificación de bacterias del género <i>Klebsiella</i> con la detección de hipermucoviscosidad en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.		
Número de cepas hipermucoviscosas	Número de cepas no hipermucoviscosas	Total de cepas
1	29	30

Figura 3. Relación entre la identificación de bacterias del género *Klebsiella* con la detección de hipermucoviscosidad en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

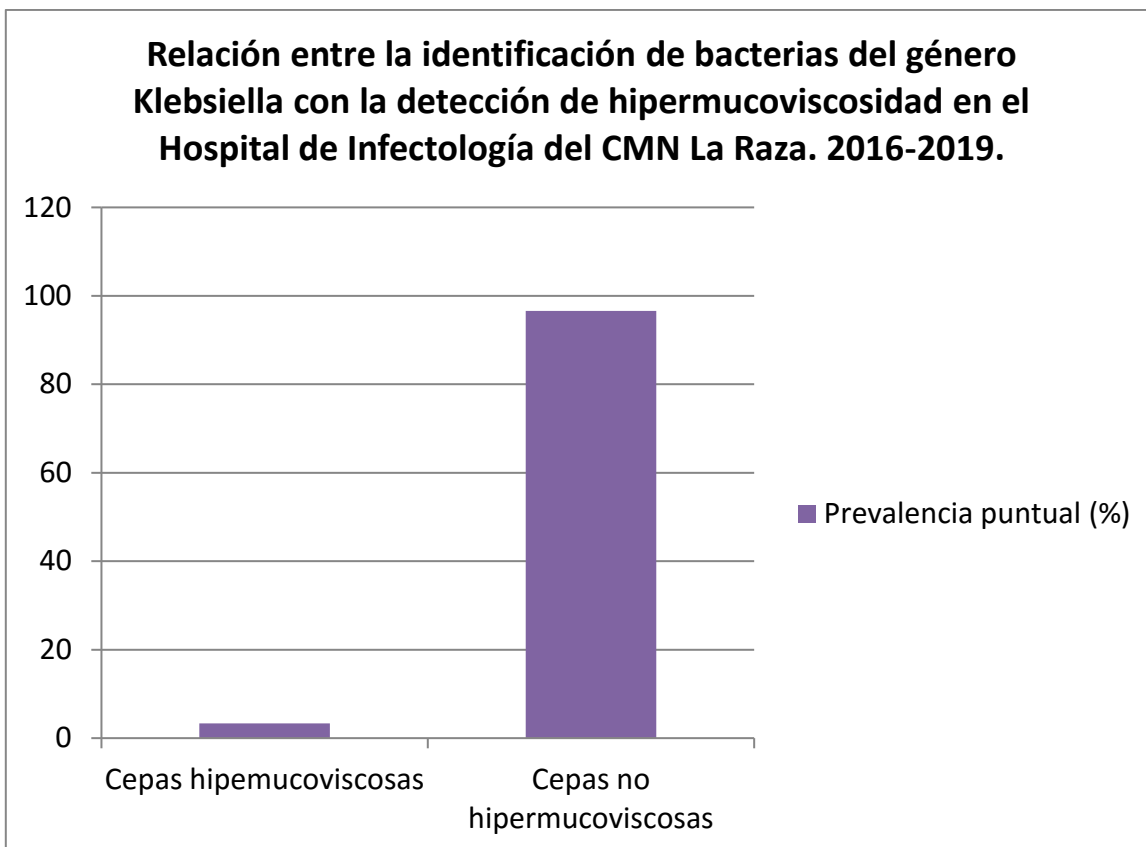


Tabla 15. Prevalencia puntual de cepas hipermucoviscosas y no hipermucoviscosas en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Prevalencia puntual de cepas hipermucoviscosas	Prevalencia puntual de cepas no hipermucoviscosas
3.3%	96.6%

Tabla 12. Número de cepas del género *Klebsiella* hipermucoviscosa y no hipermucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Cepas del género <i>Klebsiella</i> hipermucoviscosa y no hipermucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.		
Número de cepas BLEE positivas	Número de cepas BLEE negativas	Total de cepas
29	1	30

Figura 2. Número de cepas del género *Klebsiella* hipermucoviscosa y no hipermucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Número de cepas del género *Klebsiella* hiper mucoviscosa y no hiper mucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

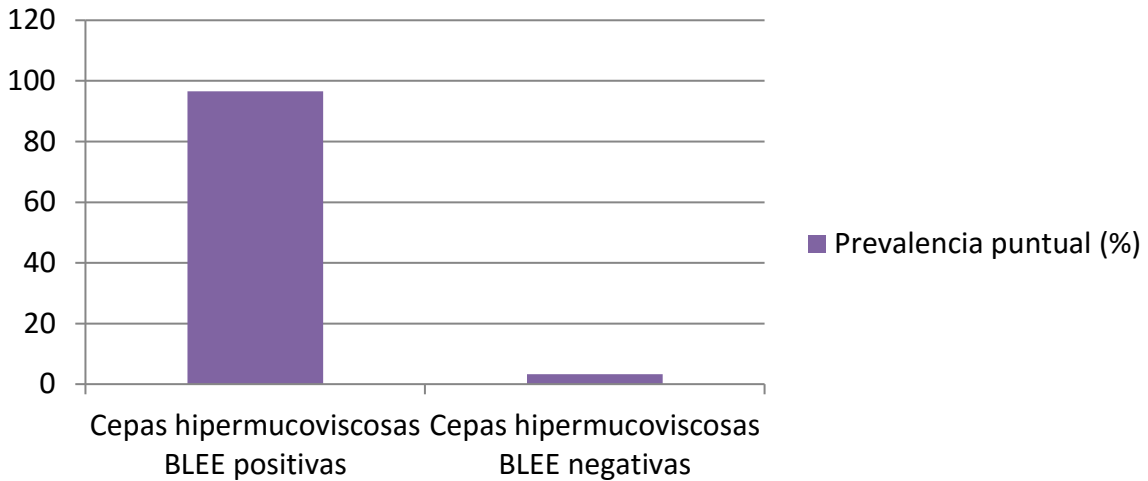


Tabla 13. Prevalencia puntual de cepas del género *Klebsiella* hiper mucoviscosa y no hiper mucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Prevalencia puntual de cepas BLEE positivas	Prevalencia puntual de cepas BLEE negativas
96.6%	3.3%

Tabla 12. Número de cepas del género *Klebsiella* hiper mucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Cepas del género <i>Klebsiella</i> hiper mucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.		
Número de cepas hiper mucoviscosas BLEE positivas	Número de cepas hiper mucoviscosas BLEE negativas	Total de cepas hiper mucoviscosas
0	1	1

Figura 2. Número de cepas del género *Klebsiella* hiper mucoviscosa y su relación con la presencia de BLEE en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

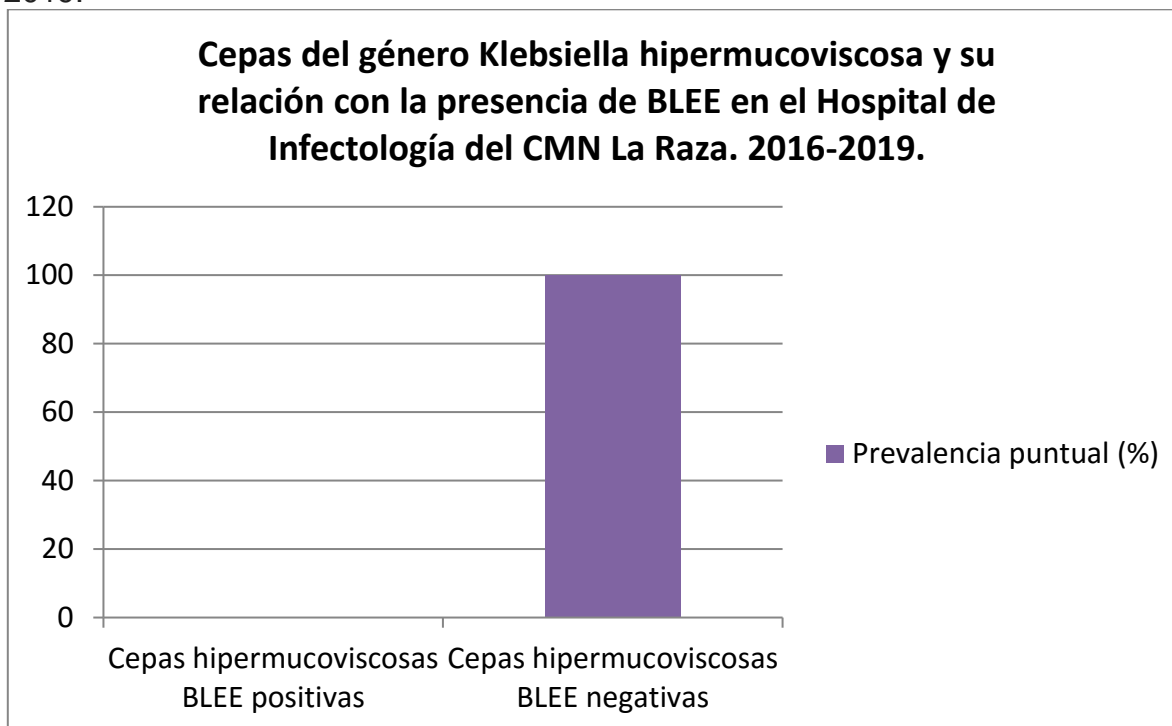


Tabla 13. Prevalencia puntual de cepas hiper mucoviscosas BLEE positivas e hiper mucoviscosas BLEE negativas en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Prevalencia puntual de cepas hiper mucoviscosas BLEE positivas	Prevalencia puntual de cepas hiper mucoviscosas BLEE negativas
0%	100%

Tabla 16. Número de cepas del género *Klebsiella* no hiper mucoviscosa BLEE positivas tipo *SHV* y/o *CTX-M* en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Bacterias del género <i>Klebsiella</i> no hiper mucoviscosa BLEE positivas tipo <i>SHV</i> y/o <i>CTX-M</i> en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.		
Número de cepas BLEE positivas tipo <i>SHV</i>	Número de cepas BLEE positivas no <i>SHV</i>	Total de cepas
20	9	29
Número de cepas BLEE positivas tipo <i>CTX-M</i>	Número de cepas BLEE positivas no <i>CTX-M</i>	Total de cepas
11	18	29
Número de cepas BLEE positivas tipo <i>SHV</i> y <i>CTX-M</i>	Número de cepas BLEE positivas no <i>SHV</i> y <i>CTX-M</i>	Total de cepas
8	21	29

Figura 4. Número de cepas del género *Klebsiella* no hiper mucoviscosa BLEE positivas tipo *SHV* y/o *CTX-M* en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

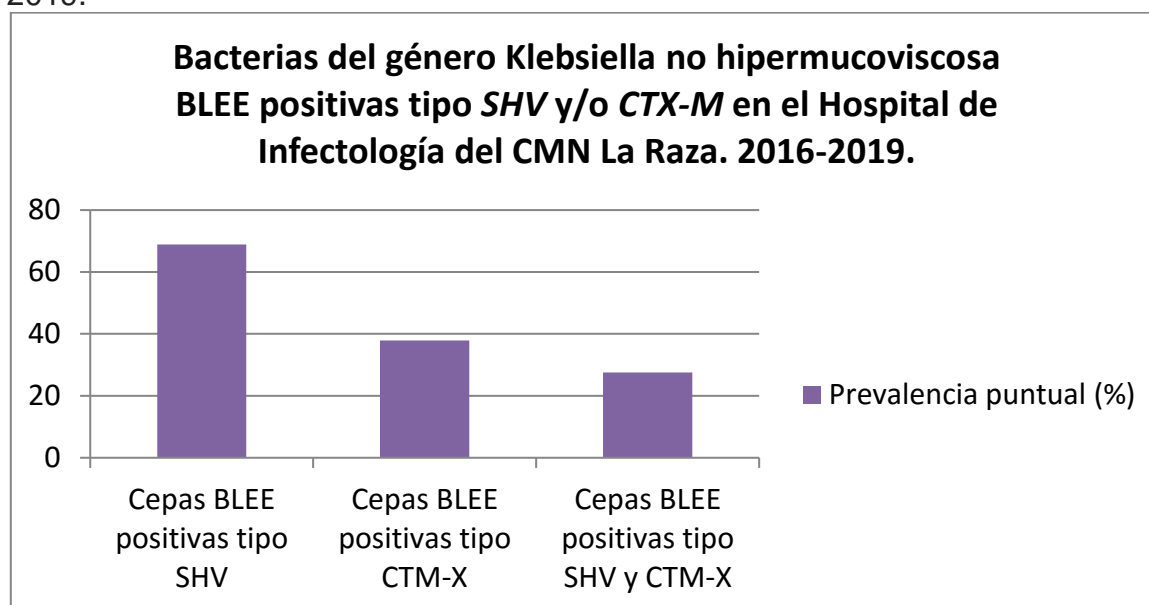


Tabla 17. Prevalencia puntual de cepas del género *Klebsiella* no hiper mucoviscosa BLEE positivas tipo *SHV* y/o *CTX-M* en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Prevalencia puntual de cepas BLEE positivas tipo <i>SHV</i>	Prevalencia puntual de cepas BLEE positivas tipo <i>CTX-M</i>	Prevalencia puntual de cepas BLEE positivas tipo <i>SHV</i> y <i>CTX-M</i>
68.9%	37.9%	27.5%

Tabla 18. Número de cepas del género *Klebsiella* hiper mucoviscosa BLEE negativa con BLEE tipo *SHV* y/o *CTX-M* en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Bacterias del género <i>Klebsiella</i> hiper mucoviscosa BLEE negativa con BLEE tipo <i>SHV</i> y/o <i>CTX-M</i> en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.			
Número de cepas hiper mucoviscosas BLEE tipo <i>SHV</i>	Número de cepas hiper mucoviscosas BLEE tipo <i>CTX-M</i>	Número de cepas hiper mucoviscosas BLEE tipo <i>SHV</i> y <i>CTX-M</i>	Total de cepas
0	0	0	1

Figura 5. Prevalencia puntual de cepas del género *Klebsiella* hiper mucoviscosa BLEE negativa con BLEE tipo *SHV* y/o *CTX-M* en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

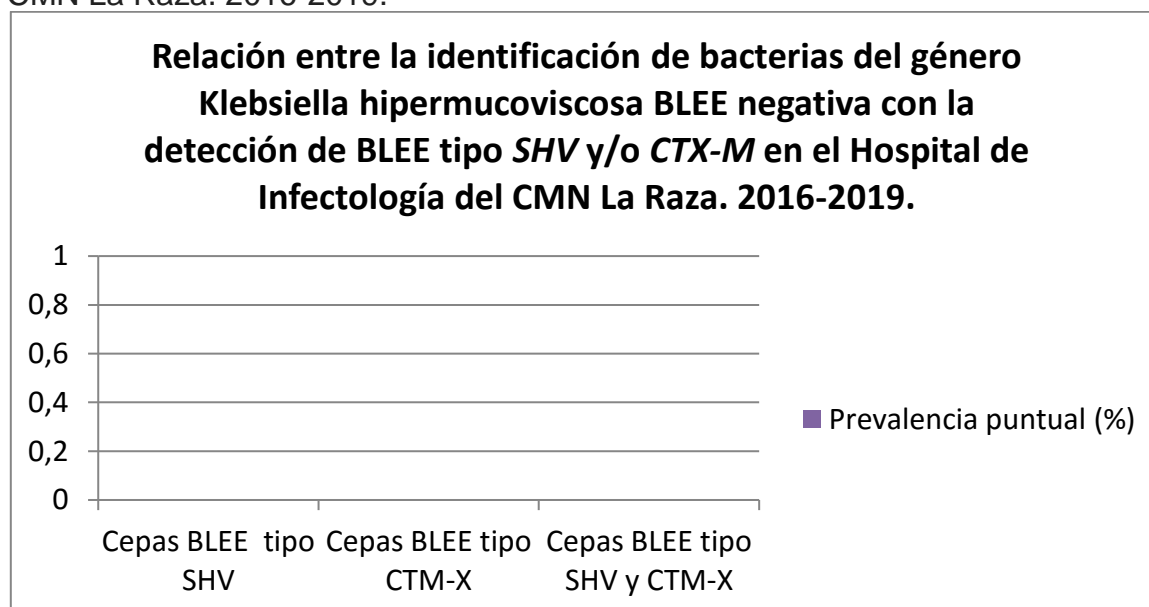


Tabla 19. Prevalencia puntual de cepas del género *Klebsiella* hiper mucoviscosa BLEE negativa con BLEE tipo *SHV* y/o *CTX-M* en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

Prevalencia puntual de cepas hiper mucoviscosas BLEE tipo <i>SHV</i>	Prevalencia puntual de cepas hiper mucoviscosas BLEE tipo <i>CTX-M</i>	Prevalencia puntual de cepas hiper mucoviscosas BLEE tipo <i>SHV</i> y <i>CTX-M</i>
0%	0%	0%

IX. DISCUSIÓN

Del total de cepas del género *Klebsiella* analizadas en este estudio, solamente una es hipermucoviscosa según el resultado de la Prueba del Hilo, única prueba establecida universalmente para detectar el fenotipo hipermucoviscoso. La frecuencia absoluta y relativa de cepas del género *Klebsiella* hipermucoviscosa en el Hospital de Infectología del CMN La Raza durante el periodo 2016 a 2019, es de una unidad. Asimismo, la prevalencia de cepas del género *Klebsiella* no hipermucoviscosas es 93.3% mayor a la prevalencia de cepas hipermucoviscosas en este estudio.

En la cepa fenotípicamente hipermucoviscosa se investigó por PCR la presencia de uno de los genes que intervienen en la expresión del fenotipo mucoide, llamado *rmpA*, el cual no pudo ser evaluado por falta de material, sin embargo, la presencia o ausencia de este gen no es indispensable para determinar que la cepa del género *Klebsiella* sea fenotípicamente hipermucoviscosa pues se conocen otros genes necesarios para la producción de la cápsula.

Casi todas las cepas del género *Klebsiella* de este estudio son productoras de BLEE, con una prevalencia puntual de 96.6%, y el 3.3% restante de cepas son bacterias del género *Klebsiella* hipermucoviscosa, quienes no son productoras de BLEE acorde a los rangos para el Método de difusión en disco del CLSI año 2019. A partir de este hallazgo en la investigación es evidente que no existe relación entre la producción de BLEE en bacterias del género *Klebsiella* con fenotipo

hipermucoviscoso aquí estudiadas, ya que la prevalencia puntual de cepas hipermucoviscosas BLEE negativas es del 100%. Cabe mencionar que, debido a la escasez de recursos económicos, en algunas cepas que resultaron productoras de BLEE con los discos impregnados de alguno de los dos tipos de cefalosporinas utilizadas, no se repitió la prueba de resistencia a BLEE con los discos de la cefalosporinasa faltante a detectar, sin que esta acción interviniera en la validez de los resultados.

Se realizó una Curva de temperatura en PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados para los genes *SHV* y *CTX-M*, así se estandarizó el método, y no se encontró el gen *SHV* ni el gen *CTX-M* en 72.5% de las cepas de bacterias del género *Klebsiella* fenotípicamente productoras de BLEE, por lo que en esas cepas otra enzima es la responsable del genotipo que establece la resistencia a BLEE. Por otra parte, la prevalencia puntual de cepas BLEE positivas tipo *SHV* fue mayor a la prevalencia puntual de cepas BLEE positivas tipo *CTX-M* por una diferencia de 31%. También se determinó en la cepa del género *Klebsiella* hipermucoviscosa la presencia de BLEE tipo *SHV* y/o *CTX-M*, la cual fue del 0%, apoyando este resultado el fenotipo BLEE negativo de esta cepa.

X. CONCLUSIONES

La cepa del género *Klebsiella* hipermucoviscosa encontrada en este estudio de investigación, tiene un comportamiento acorde a la mayoría de las bacterias del género *Klebsiella* hipermucoviscosa reportadas alrededor del mundo, ya que al igual que el común de aquellas, esta cepa no es productora fenotípicamente ni genotípicamente de BLEE, y aunque no se determina si la cepa hallada en este estudio es genotípicamente afín a uno de los genes responsables del fenotipo hipermucoviscoso, es indudable su hipermucoviscosidad, por lo que resulta evidente que no existe relación entre la presencia de BLEE con la producción de hipermucoviscosidad.

A nivel mundial las bacterias del género *Klebsiella* hipermucoviscosa BLEE positivas son de rara ocurrencia, y en este estudio se comprobó, sin embargo, nuestro hallazgo no concuerda con los datos que se han publicado en estos últimos cinco años de casos de bacterias del género *Klebsiella* hipermucoviscosa en México productoras de BLEE, así que con la información de la actual investigación y los resultados más recientes reportados en nuestro país, se hace claro que en México es posible encontrar bacterias del género *Klebsiella* hipermucoviscosa no productoras de BLEE que no son reportadas en estudios científicos, muy probablemente porque no son hipervirulentas, pero que es importante tener en cuenta por la posibilidad que tienen de hacerse resistentes y por ende hipervirulentas.

Así mismo, el total de las cepas del género *Klebsiella* no hipermucoviscosa en esta investigación son productoras de BLEE, hallazgo que refuerza a los más recientes informes que indican la importancia a nivel mundial de las bacterias del género *Klebsiella* en el grupo de microorganismos multirresistentes a antimicrobianos causantes de infecciones bacterianas.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Paczosa M, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016; 80 (3): 629-661.
2. Koneman E, Procop G, Church D, Hall G, Janda W, Schreckenberger P, et al. Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas. Séptima edición. Editorial Wolters Kluwer. 2017. 1606 páginas.
3. Márquez K, Rojas A, Camacho G. *Klebsiella* productora de carbapenemasa en pediatría: revisión de la literatura. 2017; 30 (3): 107-115.
4. Jae J. *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess. *Infect Chemother*. 2018; 50 (3): 210-218
5. Catalán JC, Garza U, Barrios H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes?. *VIRULENCE*. 2017; 8 (7): 1111-1123.
6. Shon AS, Bajwa R, Russo T. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. A new and dangerous breed. *Virulence*. 2013; 4 (2): 107-118.
7. Poothakuzhiyil R, Mariappan S, Uma S. Occurrence and characterization of hyperviscous K1 and K2 serotype in *Klebsiella pneumoniae*. *J Lab Physicians*. 2018; 10(3): 283–288.
8. Lee CH, Chang CC, Liu JW, Chen RF, Yang KD. Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis. *Virulence*. 2014; 5 (6): 673–679.

9. Lifeng W, Dingxia S, Hua W, Yanning M. Resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to both intracellular and extracellular killing of neutrophils. PLOS ONE. 2017; 12 (3): 1-10.
10. Kabha K, Nissimov L, Athamna A, Keisari Y, Parolis H, Parolis L, et al. Relationships among Capsular Structure, Phagocytosis, and Mouse Virulence in *Klebsiella pneumoniae*. INFECTION AND IMMUNITY. 1995; 63 (3): 847–852.
11. Sahly H, Keisari Y, Ofek I. Manno (Rhamno) Biose-Containing Capsular Polysaccharides of *Klebsiella pneumoniae* Enhance Opsono-Stimulation of Human Polymorphonuclear Leukocytes. J Innate Immun. 2009; 1: 136–144.
12. Follador R, Heinz E, Wyres K, Ellington M, Kowarik M, Holt K, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. Microbiology Society. 2016; 1-15.
13. Tan T, Ong M, Cheng Y, Yong L. Hypermucoviscosity, *rmpA*, and aerobactin are associated with community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremic isolates causing liver abscess in Singapore. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2017; 20: 1-5.
14. Hsin-An L, Ya-Li H, Kao-Ming Y, Siu LK, Jung-Chung L, Feng-Yee C. Regulator of the mucoid phenotype A gene increases the virulent ability of extended-spectrum beta-lactamase-producing serotype non-K1/K2 *Klebsiella pneumoniae*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 2016; 49: 494-501.

15. Seibert G, Hörner R, Holzschuh B, Alves R, Frasson NL, Salla A. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. *Einstein*. 2014;12(3):282-286.
16. Vera A, Barría C, Carrasco A, Lima C, Aguayo A, Domínguez M, et al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Rev Chilena Infectol*. 2017; 34 (5): 476-484.
17. Jun L, Ming Li G, Li Yao L, Xia Lei W, Shao Long H, Yong Z, et al. Association of antibiotic resistance with SHV-12 extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2016; 11: 269-276.
18. Seral García C, Pardos de la Gándara M, Castillo García FJ. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28: 12-18.
19. López Velandia DP, Torres Caycedo MI, Prada Quiroga CF. Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Rev Univ. Salud*. 2016; 18: 190-202.
20. Cailin L, Shangshang Q, Hui X, Lijuan X, Di Z, Xuchun L, et al. New Delhi Metallo- β -Lactamase 1 (NDM-1), the Dominant Carbapenemase Detected in Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae* from Henan Province, China. *Plos One*. 2015; 1-9.
21. Khan AU, Nordmann P. NDM-1-producing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* from diabetic foot ulcers in India. *J Med Microbiol*. 2012; 61: 454-6.

22. Carrillo R, Díaz MA, Peña C. Síndrome de absceso hepático secundario a *Klebsiella pneumoniae* hiper mucoviscosa. Una entidad emergente. *Med Int Mex.* 2013; 29: 533-536.
23. Garza U, Barrios H, Moreno S, Toribio J, Jardón D, Cuevas J, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Klebsiella* spp. isolates causing community-acquired infections. *New Microbes and New Infections.* 2018; 23: 17-27.
24. World Health Organization. GLASS REPORT Early implementation. 2017. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259744/9789241513449-eng.pdf;jsessionid=7EC8EB8B95BECA5FDE75B466917B7247?sequence=1>
25. Carrillo R, Soto JL, Peña CA, Carrillo LD, Carrillo CA, Carrillo DM. Síndrome de absceso hepático secundario a *Klebsiella pneumoniae* hiper mucoviscosa con involucro pulmonar. *Gaceta Médica de México.* 2013; 149: 102-107.
26. Paskova V, Medvecký M, Skalová A, Chudejová K, Bitar I, Jakubů V, et al. Characterization of NDM-Encoding Plasmids From Enterobacteriaceae Recovered From Czech Hospitals. *Frontiers in Microbiology.* 2018; 9 (1549): 1-12.
27. Dehshiri M, Sajjad S, Zoladl M, Abdolmajid S, Parhizgari N, Hossein M, et al. The frequency of *Klebsiella pneumoniae* encoding genes for CTX-M, TEM-1 and SHV-1 extended-spectrum beta lactamases enzymes isolated from urinary tract infection. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2018; 17(4): 1-7.
28. Aquino A, Merida J, Arias E, Arzate P, De Colsa A. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Mexico: report of seven non-clonal cases in a pediatric hospital. *BMC Microbiology.* 2018;18: 1-8.

29. Enas A, Salwa F, Brent H, Valiente E, Pimentel G. Detection of new SHV-12, SHV-5 and SHV-2a variants of extended spectrum Beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Egypt. *Newire Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2013; 12-16.
30. Campos T, Gonçalves L, Magalhães K, Martins V, Júnior G, Peirano G, et al. A Fatal Bacteremia Caused by Hypermucousviscous KPC-2 Producing Extensively Drug-Resistant K64-ST11 *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *Frontiers in Medicine*. 2018; 5 (265): 1-7.
31. Xu M, Li A, Kong H, Zhang W, Chen H, Fu Y, et al. Endogenous endophthalmitis caused by a multidrug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain belonging to a novel single locus variant of ST23: first case report in China. *BMC Infectious Diseases*. 2018; 18: 1-6.
32. Paraschiv F, Popescu G, Borcan A. Septic cutaneous emboli revealing a severe case of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess syndrome. *JMM*. 2018; 5: 1-3.
33. Lee B, Yeroushalmi K, Me H, Sojitra P, Jilani U, Iqbal S, et al. Community acquired *Klebsiella pneumoniae* meningitis: a case report. *GERMS*. 2018; 8 (2): 92-95.
34. Maheswaranathan M, Ngo T, Rockey D. Identification and Management of the Hypervirulent Invasive *Klebsiella pneumoniae* Syndrome: A Unique and Distinct Clinical Entity. *Journal of Investigative Medicine High Impact*. 2018; 6: 1-4.

XII. ANEXOS

1. HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Frecuencia de cepas del género *Klebsiella* hipermucoviscosa y su relación con la presencia de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en el Hospital de Infectología del CMN La Raza. 2016-2019.

NSS: _____ FOLIO INTERNO: _____

TIPO DE MUESTRA:

- A) Hemocultivo _____
 B) Respiratorio _____

Cepas de <i>Klebsiella</i> con fenotipo hipermucoviscoso	PRUEBA DE HILO	HIPERMUCOVISCOSA
	POSITIVO <input type="checkbox"/> NEGATIVO <input type="checkbox"/>	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Cepas de <i>Klebsiella</i> con producción de BLEE	METODO DIFUSIÓN EN DISCO	BLEE
	POSITIVO <input type="checkbox"/> NEGATIVO <input type="checkbox"/>	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Cepas de <i>Klebsiella</i> con expresión del gen <i>rmpA</i>	PCR	Expresión del gen regulador del fenotipo mucoide A
	POSITIVO <input type="checkbox"/> NEGATIVO <input type="checkbox"/>	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>

2. METODOS MICROBIOLÓGICOS

FLUJOGRAMA DE TRABAJO:

