



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)
en cepas de *Klebsiella pneumoniae* colonizantes de pacientes
pediátricos oncológicos**

T E S I S

Que para obtener el título de
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Presenta

MARTÍNEZ RAMOS LIZBETH MARIANA

Director de tesis: Dra. Raquel Retana Ugalde

Asesor de tesis: D. en C. Leticia Verónica Jiménez Rojas

Realizada en

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE INFECTOLOGÍA



CDMX

2020



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.

Agradecimientos

Mi sincero agradecimiento al Hospital Infantil de México Federico Gómez por proporcionar el espacio y los fondos para llevar a cabo este trabajo.

A la Dra. Leticia Verónica Jiménez Rojas por la paciencia, el tiempo y por dejarme formar parte de este protocolo, pero sobre todo por la experiencia brindada.

A los compañeros, doctores y maestros que forman parte del Laboratorio de Investigación de Bacteriología, por los consejos brindados para mejorar procedimientos, por las risas, los buenos ratos y hacer más amena la estancia.

A los profesores de Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindar y compartir su conocimiento para mi formación profesional.

A mi familia, que aunque no nos veamos seguido, sé que me apoyan.

A mis amigas y amigos por el apoyo, ánimo invaluable y procurarme a lo largo de todo este arduo proceso.

Dedicatoria

A todo aquel individuo que sin importar el mal pronóstico, cumple sus objetivos.

Índice

1. Resumen.....	6
2. Introducción	9
3. Marco teórico.....	11
3.1. Antibióticos como herramienta terapéutica.....	11
3.2. Familia de los antibióticos β -lactámicos.....	12
3.3. Resistencia a antibióticos	16
3.4. Género <i>Enterobacteriaceae</i> y la relevancia clínica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
3.5. β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) presentes en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
3.6. Colonización por <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE en pacientes pediátricos oncológicos	23
3.7. Biología molecular de la mano de la microbiología	24
3.8 Almacenamiento del DNA.....	31
4. Planteamiento del problema.....	31
5. Hipótesis	33
6. Objetivos.....	33
6.1. Objetivo general.....	33
6.2. Objetivos específicos	33
7. Diseño del estudio	34
7.1. Universo de estudio.....	34

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

7.2. Criterios de inclusión	34
7.3. Criterios de exclusión	34
7.4. Variables	35
7.4.1. Variables dependientes	35
7.4.2. Variables independientes	35
7.5. Análisis estadístico	36
8. Material y metodología	36
8.1. Conservación de las cepas	39
8.2. Aislamiento de colonias	39
8.3. Extracción de DNA	39
8.4. Preparación de pools de DNAs bacterianos	41
8.5. Hidratación de cebadores específicos para emplear en las PCRs Multiplex	41
8.6. Amplificación de DNA bacteriano por PCR Multiplex	42
8.7. Electroforesis	44
8.9. Análisis de los genes de resistencia	45
9.Resultados	45
10.Discusión	51
11. Conclusión	58
12. Perspectivas	59
13. Referencias	59

1. Resumen

Klebsiella pneumoniae es un bacilo gramnegativo, conocido como una de las mayores amenazas en salud pública, es el factor más común de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) y en infecciones adquiridas en la comunidad. Lo anterior, se puede atribuir a los factores de virulencia y mecanismos de resistencia que hoy día presenta y que le confieren multidrogoresistencia a diferentes antibióticos. El siguiente estudio presenta el análisis de 45 cepas identificadas como *Klebsiella pneumoniae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en pacientes pediátricos con diversos tipos de cáncer en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, en donde se identificaron por medio de 10 PCR multiplex con 32 de los genes codificantes de BLEE de mayor diseminación a nivel mundial. En la población estudiada únicamente se presentaron los siguientes genes: CTXMGp-1 en 40 cepas (88.9%), SHV en 40 cepas (88.9%), TEM en 38 cepas (84.4%), CTXMGp-9 en 2 cepas (4.4%). En cuanto a los cuatro genes que pertenecen a la familia de las Oxacilinasas (OXA), se presentaron en las 45 cepas de *Klebsiella pneumoniae* BLEE: O1GD2M en 44 cepas (97.8%), OXA en 34 cepas (75.6%), O2GD2M en 1 cepa (2.2%) y O51GD2M en 1 cepa (2.2%). Además, se demostró que 2 cepas (5.7%) fueron resistentes a ampicilina-sulbactám, 2 cepas (5.7%) fueron resistentes a piperacilina-tazobactám, 2 cepas (5.7%) fueron resistentes a cefepime. En conclusión: Se identificaron los genes codificantes de β -lactamasas

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

de espectro extendido que le están confiriendo multidrogoresistencia a la cepas de *Klebsiella pneumoniae*, siendo CTXMGp-1 el gen más prevalente en pacientes pediátricos oncológicos dentro del Hospital Infantil Federico Gómez.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is a gram-negative bacillus, known as one of the greatest threats in public health, it is the most common factor in infections associated with health care (IAAS) and in infections acquired in the community. The above can be attributed to the virulence factors and resistance mechanisms that *Klebsiella pneumoniae* presents today and they give it multidrugresistance to different antibiotics. The following study presents the analysis of 45 strains identified as *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum β -lactamasas (ESBL) in pediatric patients with various types of cancer at the Federico Gomez Children's Hospital of Mexico, where they were identified by means of 10 PCR multiplex with 32 of the BLEE coding genes with the greatest spread worldwide. In the study population, only the following genes was presented: CTXMGp-1 in 40 strains (88.9%), SHV in 40 strains (88.9%), TEM in 38 strains (84.4%), CTXMGp-9 in 2 strains (4.4%) As for the four genes belonging to the Oxacillinase family (OXA): O1GD2M in 44 strains (97.8%), OXA in 34 strains (75.6%), O2GD2M in 1 strain (2.2%) and O51GD2M in 1 strain (2.2%), were presented in the 45 *Klebsiella pneumoniae* BLEE strains. In addition, it was shown that 2 strains (5.7%) were resistant to ampicillin-sulbactam, 2 strains (5.7%) were resistant to piperacillin-tazobactam, 2 strains (5.7%) were resistant to cefepime. In conclusion: The genes coding for extended-spectrum β -lactamasas that are giving multidrugresistance to

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

the *Klebsiella pneumoniae* strains were identified, with CTXMGp-1 being the most prevalent gene in pediatric cancer patients within the Federico Gomez Children's Hospital.

2. Introducción

La resistencia a los antibióticos, incluyendo los de amplio espectro, que presentan los microorganismos, va en aumento y hoy día representa un desafío terapéutico. Dicha resistencia ha sido reconocida por la OMS como uno de los mayores peligros para la salud humana.¹

Klebsiella pneumoniae como agente etiológico de diversas enfermedades que comprometen la vida del paciente, además de presentar mecanismos que le confieren virulencia, ha mostrado alta resistencia a múltiples antibióticos de diferentes grupos, convirtiendo a esta bacteria en multidrogoresistente, y en especial a los antibióticos β -lactámicos, por contener enzimas conocidas como β -lactamasas, que hidrolizan el anillo β -lactámico que contienen estos antibióticos. Cabe señalar que dichos antibióticos a nivel mundial, son los más aplicados en hospitales y en tratamientos terapéuticos.

Ahora bien, las enzimas β -lactamasas de espectro extendido son conocidas porque son capaces de hidrolizar un espectro más amplio de antibióticos β -lactámicos, incluyendo penicilinas, monobactámicos y la mayoría de cefalosporinas hasta las de tercera generación; limitando de esta manera las opciones terapéuticas efectivas. Estas enzimas son un grupo muy heterogéneo; en la actualidad hay descritas más de 1400 en todo el mundo.^{24, 25}

Aunado a esto, los tratamientos que reciben los pacientes con cáncer, tanto radioterapia como quimioterapia, pueden producir una mucositis, que puede ser

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

una puerta de entrada para microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal, como lo hace *Klebsiella pneumoniae*, y de esta manera causar un proceso séptico al ingresar al torrente sanguíneo.^{37, 38}

3. Marco teórico

3.1. Antibióticos como herramienta terapéutica

La historia de los antibióticos comienza en 1928, cuando Alexander Fleming logró su principal descubrimiento, la penicilina. La generalización de su empleo permitió desde entonces reducir la morbilidad asociada a enfermedades infecciosas en forma muy significativa.^{1, 2}

En la actualidad los antimicrobianos son una herramienta terapéutica con la que cuenta el personal clínico para contrarrestar las patologías infecciosas presentadas, éstos pueden ser producidos por otros microorganismos para inhibir el crecimiento, o pueden ser sintetizados en plantas farmacéuticas, con un mismo fin; el de eliminar al patógeno del hospedero.^{3, 4, 5, 6}

Los antibióticos conforman una amplia gama de sustancias con diferente farmacocinética y farmacodinamia. Entre algunas características que poseen, por mencionar algunas: ejercen una función específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica a bajas concentraciones y con toxicidad selectiva, es decir, contienen una mínima toxicidad para las células del cuerpo humano. La gran variedad de estos, hace necesaria la existencia de una clasificación. Para esto se utilizan diferentes criterios como: origen, mecanismo y espectro de acción, forma de actuar y estructura química. Los antibióticos se pueden agrupar de la siguiente manera: betalactámicos, glicopéptidos, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos y quinolonas.^{1, 7}

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

En este trabajo sólo se tomó como objeto de estudio a los antibióticos que contienen un anillo betalactámico, al ser los más prescritos en atención primaria, en hospitales y en tratamientos contra infecciones en todo el mundo.^{1, 21} Además de que se determinaron los genes que codifican las enzimas que hidrolizan a estos antibióticos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

3.2. Familia de los antibióticos β -lactámicos

Son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por contener en su estructura un anillo betalactámico. Son antibióticos de acción bactericida lenta, presentan mínima toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. Inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, ya que inhiben la transpeptidación en las etapas finales de la formación del peptidoglicano, polímero esencial de la pared bacteriana; dicha alteración activa a las enzimas autolíticas que provocan la destrucción de la bacteria. Actúan en la fase de reproducción celular, no son efectivos contra microorganismos que no contengan pared bacteriana como los micoplasmas.^{7, 8, 9, 10}

El espectro de los β -lactámicos incluye bacterias gramnegativas, bacterias grampositivas y espiroquetas. Se pueden clasificar en cinco grupos: a) penicilinas, b) cefalosporinas, c) carbapenémicos, d) monobactámicos, e) inhibidores de betalactamasas.^{7, 9, 10}

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Tabla 1. Características generales de las Penicilinas.

Penicilinas^{7, 9, 10}

Modo de acción	El general de los betalactámicos.
Estructura química	Contienen el núcleo de ácido 6-aminopenicilánico, que consiste en un anillo betalactámico unido a un anillo tiazolidínico. (Figura 1).
Toxicidad	Pueden producir reacciones alérgicas en un 5% de la población al combinarse la estructura β -lactámica con proteínas orgánicas.
Farmacocinética	Por mencionar algunos antibióticos dentro de este grupo: La penicilina natural (penicilina G) sólo se absorbe un 30% por vía oral y es destruida por el pH del estómago; la amoxicilina se absorbe mejor que la ampicilina por vía oral, por vía IM los niveles de su preparado acuoso disminuyen un 50% en una hora, por lo que para la vía IM se usan preparados de liberación prolongada (penicilina G procaína o benzatina). Con las meninges íntegras penetra mal al LCR, mientras que en situación de inflamación meníngea aguda y fiebre su penetración es mayor. Se elimina principalmente por vía renal.
Espectro antibacteriano	Abarca cocos grampositivos, cocos gramnegativos (<i>Neisseria meningitidis</i>) y bacilos grampositivos, tanto facultativos como anaerobios, así como espiroquetas y algunos bacilos gramnegativos anaerobios.
Resistencias	Producción de penicilasa, la elaboran diferentes bacterias como <i>E. coli</i> .

Tabla 2. Características generales de las Cefalosporinas.

Cefalosporinas^{*7, 9, 10}

Modo de acción	El general de los betalactámicos.
Estructura química	Contienen un núcleo constituido por ácido 7-acefalosporínico formado por un anillo betalactámico unido a un anillo de dihidrotiazino.(Figura 1).
Toxicidad	Margen terapéutico amplio.
Farmacocinética	La mayoría de las cefalosporinas son de administración parenteral, aunque existe un número creciente de formulaciones para vía oral. La absorción gastrointestinal de estos compuestos es buena. Todas las cefalosporinas, excepto cefoperazona de excreción biliar, se excretan primariamente por el riñón.
Espectro antibacteriano	Las cefalosporinas de primera generación son muy activas frente a los cocos grampositivos; en líneas generales, las sucesivas generaciones han perdido parte de esa actividad, en beneficio de una mayor actividad frente a bacilos gramnegativos, con algunas excepciones. Todas las cefalosporinas son inactivas frente a enterococos, estafilococos resistentes a la meticilina y <i>Listeria monocytogenes</i> .

*Se definen cuatro generaciones de cefalosporinas.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Tabla 3. Características generales de los Carbapenemes.

Carbapenemes^{7, 9, 10}

Modo de acción	El general de los betalactámicos.
Estructura química	El azufre endocíclico del anillo betalactámico está sustituido por un grupo metileno.(Figura 1).
Toxicidad	Imipenem puede producir alteraciones neurológicas.
Farmacocinética	Administración por vía IV. Por mencionar algunos antibióticos dentro de este grupo: El imipenem debe asociarse a cilastatina (inhibidor de la dehidropeptidasa I renal), que impide que sea inactivado rápidamente en el riñón. Meropenem es más estable a la dehidropeptidasa renal y puede administrarse solo. Ertapenem puede administrarse por vía IV en una sola dosis diaria.
Espectro antibacteriano	Su actividad bactericida se extiende a cocos grampositivos incluyendo <i>Staphylococcus spp.</i> , sensibles a meticilina, <i>S. pneumoniae</i> y otros <i>Streptococcus spp.</i> Sólo carecen de actividad frente a los estafilococos resistentes a meticilina, enterococos resistentes a betalactámicos, algunas especies de <i>Pseudomonas</i> y <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> . Es activo sobre la mayoría de aislamientos de enterobacterias y <i>Haemophilus spp.</i> , incluyendo las cepas productoras de betalactamasas. Tiene una muy buena actividad anaerobicida, con excepción de <i>Clostridium difficile</i> . En el caso de ertapenem, este no es activo sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
Resistencias	Son frecuentes con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , y además son potentes inductores de beta-lactamasas por lo que aunque a los carbapenemes no les afecte, pueden inducir resistencias a otros betalactámicos.

Tabla 4. Características generales de los Monobactamas.

Monobactamas^{7, 9, 10}

Modo de acción	El general de los betalactámicos.
Estructura química	Tienen un anillo betalactámico monocíclico, es decir, los dos anillos se han reducido a uno solo. (Figura 1).
Toxicidad	Reacciones adversas comunes con otros betalactámicos, pero carece de hipersensibilidad cruzada con ellos.
Farmacocinética	Se administran por vía parenteral.
Espectro antibacteriano	Aztreonam, el único monobactámico disponible para uso clínico, posee una excelente actividad sobre bacterias gramnegativas aerobias y facultativas. Por el contrario, carece de actividad frente a grampositivos y bacterias anaerobias.
Resistencias	Tienen una elevada resistencia a la inhibición por betalactamasas, no presentan resistencia cruzada con los otros betalactámicos.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Tabla 5. Características generales de los Inhibidores de betalactamasas.

Inhibidores de betalactamasas (Ácido clavulánico, sulbactám, tazobactám)^{7, 9,10}

Modo de acción	Su actividad antibacteriana es muy limitada, pero tienen una gran afinidad por las betalactamasas, fijándose a ellas de forma irreversible. Se usan asociados a los betalactámicos; potencian su actividad bloqueando uno de los principales mecanismos de resistencia que desarrollan las bacterias.
Estructura química	Son análogos estructurales de las penicilinas, conservan el anillo betalactámico. (Figura 1).
Toxicidad	Las reacciones adversas son en general leves. Las más frecuentes son diarrea, náuseas, vómitos, exantemas cutáneos y elevación transitoria de transaminasas.
Farmacocinética	Hay tres asociaciones comercializadas: amoxicilina con ácido clavulánico, VO/IV; ampicilina con sulbactám, VO/IM; piperacilina con tazobactám, IV/IM.
Espectro antibacteriano	Los tres inhibidores de penicilinas comercializados (ácido clavulánico, sulbactám y tazobactám) siempre se usan asociados a una penicilina de amplio espectro. Su espectro incluye a los organismos que inicialmente eran susceptibles a los betalactámicos y que han dejado de serlo por la difusión de cepas productoras de penicilinasas (<i>Staphylococcus aureus</i> e incluso <i>Klebsiella spp.</i> y <i>Bacteroides fragilis</i>). Los dos primeros tienen un espectro similar, el tercero tiene un espectro antibacteriano más amplio y mayor actividad frente a gramnegativos.
Resistencias	Los inhibidores de betalactamasas hoy conocidos son capaces de inhibir las betalactamasas de tipo II a V (clasificación de Richmond-Sykes) pero no las de tipo I, producidas por <i>Serratia spp.</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , y algunas cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

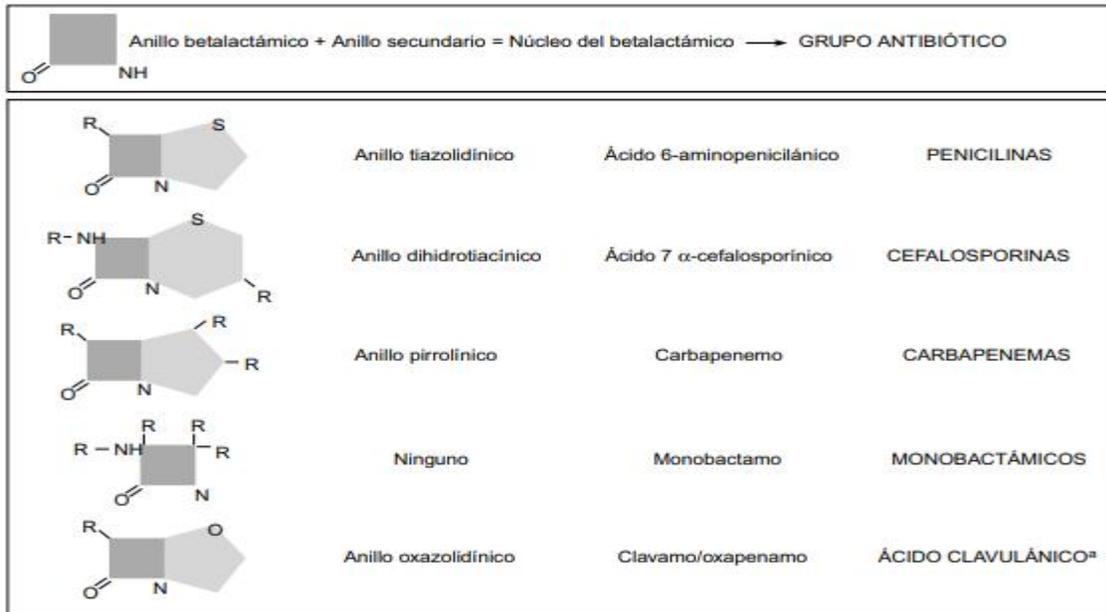


Figura 1. Estructura química de los β -lactámicos.¹⁰

3.3. Resistencia a antibióticos

Cada vez que un antibiótico es empleado de manera rutinaria, además del vacío que existe en el desarrollo de nuevas sustancias terapéuticas, las bacterias desarrollan mecanismos de defensa para resistir la acción del antimicrobiano como parte de su propia evolución.^{3, 4, 5, 6}

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno que ha ido apareciendo paralelamente al uso masivo de los mismos y ésta se puede presentar mediante la selección natural, es decir, mutaciones ocurridas al azar, o puede ser inducida por medio de la presión selectiva, debido al uso de antimicrobianos. Todo ello, ha orillado a que los microorganismos se adapten a estas condiciones tan alternas y obtengan continuamente mecanismos de resistencia.^{6, 11}

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

A nivel clínico, existe una gran cantidad de bacterias patógenas causantes de infecciones asociadas a la salud capaces de adquirir resistencia a múltiples antibióticos, conocidos como microorganismos multidrogoresistentes (MDR), los cuales generan que la efectividad en los tratamientos para inhibir a dichos microorganismos se vea disminuida o sea nula.⁶

Lo anterior ha propiciado una problemática de carácter mundial que incide directamente en los procedimientos médicos para intentar disminuir el desarrollo en el paciente infectado, en la terapia antimicrobiana y en la transmisión de dichos microorganismos. En las últimas dos décadas, ha sido tanto el aumento de enfermedades infecciosas que el patrón de salud pública en muchas partes del mundo se podría equiparar con la era preantibiótica.^{6,11}

Según la terminología internacional estandarizada, que fue creada por el Centro Europeo para el Control y la Prevención de Enfermedades (ECDC), por sus siglas en inglés, y el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta, la multidrogoresistencia (MDR) se definió como: “la no susceptibilidad adquirida, al menos a un antimicrobiano de tres o más familias de antimicrobianos.”^{12, 13, 14}

3.4. Género *Enterobacteriaceae* y la relevancia clínica de *Klebsiella pneumoniae*

Diversos estudios han comprobado que los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* pueden estar implicados en casi cualquier tipo de enfermedad infecciosa y recuperarse de cualquier muestra en el laboratorio, además de que

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

muchas de las infecciones que sufren las personas en diversos ámbitos clínicos son causadas por especies de esta familia; constituye un subgrupo importante y heterogéneo dentro de las bacterias identificadas por su pared celular como gramnegativas.^{14, 15, 16, 17}

Ampliamente dispersos en la naturaleza, microorganismos anaeróbicos facultativos, oxidasa negativos, se encuentran en la tierra y agua, sobre las plantas y como lo indica el nombre de la familia, en el tubo digestivo de seres humanos y animales. Algunas especies (*Shigella spp.*, varios serovares de *Salmonella*, *Yersinia pestis*, entre otros) se han adaptado al ser humano, considerándose patógenos primarios, mientras que otras especies (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Morganella morganii*, *Proteus spp.*, *Providencia spp.*, *Serratia spp.*, etc.) son parte de la microbiota del ser humano, pero pueden comportarse como patógenos oportunistas.^{14, 15, 16, 17}

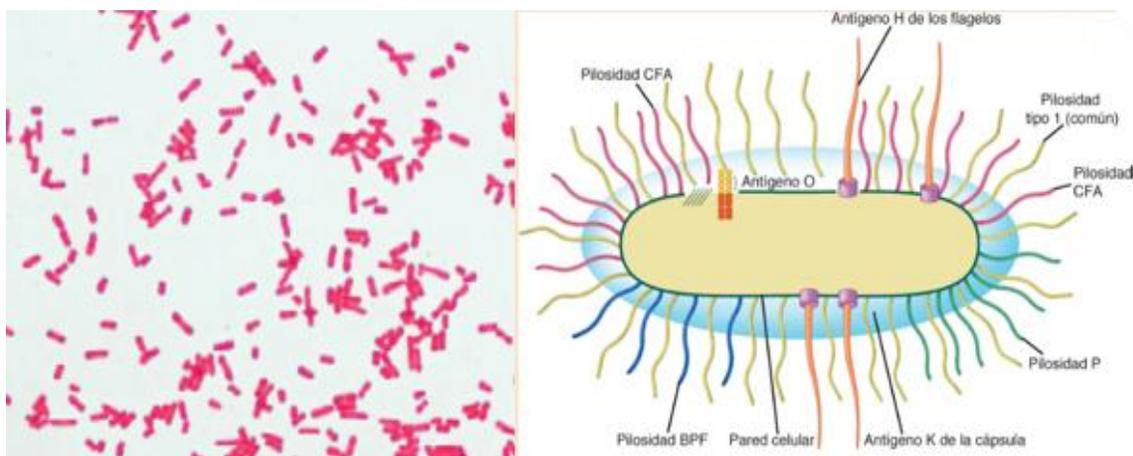


Figura 2. (Izquierda) Tinción de Gram para bacilos gramnegativos. (Derecha) Estructura del género *Enterobacteriaceae*.¹⁸

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Entre las bacterias de esta familia, el segundo género en importancia es *Klebsiella spp.*; siendo la especie más estudiada y de mayor relevancia clínica, pues como ya se mencionó desempeña un papel como agente etiológico de enfermedades infecciosas asociadas a la salud, como neumonía, septicemia e infecciones del tracto urinario.^{19, 20}

Klebsiella pneumoniae es una bacteria de forma bacilar, gramnegativa, anaerobia facultativa, inmóvil, usualmente encapsulada, morfológicamente son colonias mucoides, grandes, redondas, brillantes de color blanco en agar base sangre al 5% y de color rosa en MacConkey (Figura 3). Presente de manera especial en las superficies mucosas de mamíferos; en los seres humanos coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal. Es importante señalar que la tasa de colonización se incrementa hasta tres veces en el ambiente hospitalario, en forma directamente proporcional a la duración de la estancia y, especialmente, a la presión selectiva que ejercen los antibióticos sobre la flora comensal.¹⁹

Esta enterobacteria incrementa su virulencia, no únicamente por presentar diversos marcadores de resistencia, sino por expresar en su superficie diversos factores de adherencia (fimbrias, pili, exopolisacáridos, entre otros), que además de colonizar los tejidos del hospedero, le permiten adherirse a superficies abióticas donde se organiza en comunidades bacterianas llamadas biopelículas.²¹

Aunado a esto, *Klebsiella pneumoniae* presenta una peculiar característica de múltiple resistencia a los antibióticos β -lactámicos, principalmente por la producción de β -lactamasas. Las de interés en este estudio son las β -lactamasas

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

de espectro extendido (BLEE), aunque se debe mencionar que *Klebsiella pneumoniae* también puede presentar carbapenemasas.^{19, 21}

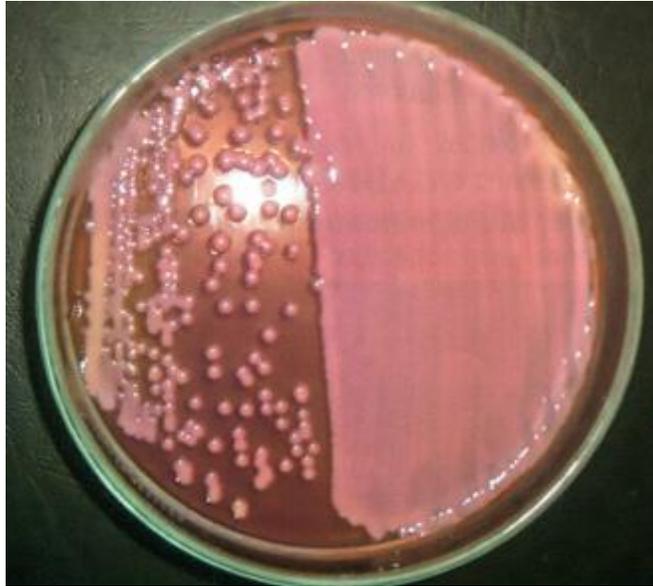


Figura 3. Colonias aisladas de *Klebsiella pneumoniae* en agar MacConkey.²²

3.5. β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) presentes en *Klebsiella pneumoniae*

Las β -lactamasas son enzimas bacterianas capaces de hidrolizar los antibióticos beta-lactámicos, inactivándolos y convirtiéndolos en inefectivos. Ahora bien, las β -lactamasas de espectro extendido son nombradas de esta manera, porque son enzimas capaces de hidrolizar un espectro más amplio de antibióticos β -lactámicos, incluyendo penicilinas, monobactámicos y la mayoría de cefalosporinas incluyendo las de tercera generación, también a otras clases de antibióticos como aminoglicósidos, cotrimoxazoles, tetraciclinas y fluoroquinolonas; limitando de esta manera las opciones terapéuticas efectivas, aumentando la morbilidad, la mortalidad e incrementando los costos hospitalarios.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Se ha registrado que las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), se pueden hallar en especies de la familia *Enterobacteriaceae* alrededor del mundo.^{23, 24, 25, 26, 27, 28}

Basándose en datos de secuencia parcial del DNA de las β -lactamasas, Ambler en 1980, propone clasificarlas en cuatro clases: A, B, C y D. En donde las enzimas de la clase A pueden subdividirse en β -lactamasas de espectro limitado de clase A, β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y serin carbapenemasas. Las de la clase B, en general son plasmídicas y se caracterizan por un átomo de zinc en su sitio activo y son consideradas por ello metalo- β -lactamasas. Las enzimas de clase C, generalmente están mediadas cromosómicamente, aunque existen β -lactamasas de clase C mediadas por plásmidos y pueden intercambiarse por conjugación. Estas enzimas, a menudo son inducibles e incluyen enzimas AmpC. Y finalmente; las enzimas de clase D, las cuales constituyen un grupo muy limitado de enzimas plasmídicas, con actividad aumentada en oxacilina (OXA-1).^{29, 30, 31, 32}

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Tabla 6. Clasificación de Ambler de las β -lactamasas.^{30, 32}

Tipo	Clase de Ambler	Molecular	Características	Ejemplos de Enzimas
β -lactamasas de espectro limitado	A		Hidrolizan penicilina, producidas primordialmente por <i>Enterobacteriaceae</i>	Penicilinasas estafilocócica, TEM-1, TEM-2, SHV-1
β -lactamasas de espectro extendido	A		Hidrolizan antibióticos de β -lactamasas de espectro limitado	SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
Serín Carbapenemasas	A		Hidrolizan carbapenemasas	KPC-1, IMI-1, SME-1
Metalo- β -lactamasas	B		Hidrolizan carbapenemasas	VIM-1, IMP-1, NDM-1
Cefalosporinasas	C		Hidrolizan cefamicinas, y algunos oximino- β -lactámicos	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
Enzimas tipo OXA Carbapenemasas	D		Hidrolizan oxacilina, oximino- β -lactámicos y carbapenemasas	Enzimas OXA

De todas las clases de β -lactamasas, las más prevalentes en cepas de *Klebsiella pneumoniae* son las que pertenecen a la clase A de la clasificación de Ambler y son TEM, SHV y CTX-M o combinaciones de éstas. Dentro de estas enzimas, las más predominantes son las CTX-M, de las cuales los grupos CTXM-1-2-8-9-14-15-25 se han descrito más frecuentemente en dichas cepas.^{25, 33, 34}

Cabe mencionar, que el grupo de enzimas CTX-M, ha tenido una gran diseminación a nivel mundial, ya que se ha convertido en el grupo más común de América Latina, en gran parte de Europa y en el Reino Unido. Además tiene

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

presencia en Asia, recientes estudios, han identificado la producción de CTX-M en países como China, Corea, Japón e India. En México, CTXM-15 es la más prevalente, seguida de SHV-12, SHV-5 y dentro de la familia GES, están GES-1, GES-19.^{35, 52, 53, 54}

3.6. Colonización por *Klebsiella pneumoniae* BLEE en pacientes pediátricos oncológicos

La microbiota intestinal es esencial en la protección contra la colonización de bacterias patógenas, en el metabolismo energético, en la nutrición, en el desarrollo y funcionamiento del sistema inmunológico y en el mantenimiento de la integridad anatómica de la mucosa intestinal. Su composición no únicamente depende de factores genéticos, sino también de factores ambientales, como la dieta, estilo de vida, uso de antibióticos, por mencionar algunos. Los cambios que se pueden presentar en la composición de la microbiota intestinal inducidos por alguno de estos factores previamente mencionados, ocasionan un estado de disbiosis que es cuando las bacterias comensales se ven afectadas y hay una pérdida de éstas, generando un desequilibrio y aumentando el riesgo de padecer enfermedades infecciosas, causadas por bacterias patógenas oportunistas como lo es *Klebsiella pneumoniae*.^{35, 36}

Los tratamientos oncológicos, tanto la radioterapia como la quimioterapia, pueden producir como efecto secundario una mucositis, que puede ser una puerta de entrada para microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal. En este estado de disbiosis, ocasionado por los tratamientos; las bacterias pueden ingresar al organismo por translocación, es decir, migran a través de la barrera

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

mucosa dañada y de esta manera pueden llegar al torrente sanguíneo iniciando el proceso séptico.^{37, 38}

La translocación bacteriana está relacionada con; la inflamación de la mucosa, provocada por la administración de agentes empleados en quimioterapia, la prescripción de glucocorticoides, la inmunosupresión; que disminuyen los mecanismos de defensa y el aumento en el número de bacterias intestinales por sobre crecimiento, estasis intestinal o adquisición de bacterias exógenas.³⁷

3.7. Biología molecular de la mano de la microbiología

La tipificación molecular se ha convertido en una herramienta indispensable en el control de infecciones asociadas a la salud (IAAS), ya que permite detectar la transmisión dentro de los hospitales de patógenos y la identificación de fuentes y rutas de transmisión en entornos de brotes. Existen diferentes métodos para la tipificación molecular, en este estudio se optó por la amplificación de DNA por PCR.³⁹

Para la cual se requiere del aislamiento de las bacterias en cultivo puro. El medio de cultivo, es el sitio donde se lleva a cabo la proliferación y multiplicación de las bacterias y es necesario esperar al menos de 18 a 24 horas para visualizarlas. Uno de los medios más empleados en los laboratorios es el agar base sangre de carnero al 5%, el cual es rico en nutrientes que permiten el crecimiento de la gran mayoría de las bacterias.⁴⁰

Los medios de enriquecimiento son empleados para recuperar bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales, otro de los más utilizados suele ser el agar

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

BHI Infusión Cerebro Corazón, el cual proporciona un adecuado desarrollo microbiano. Los medios diferenciales se emplean para manifestar características distintivas de las colonias, son medios que logran distinguir los distintos grupos bacterianos en función de las características metabólicas y lo ponen de manifiesto mediante el color de las colonias. El agar MacConkey es un medio sólido que permite el crecimiento de bacilos gramnegativos fermentadores de lactosa que adoptan una coloración rosada-rojiza y los no fermentadores de lactosa, que son colonias del color del medio o son colonias incoloras.^{40, 41, 42}

Sobre la conservación de las cepas obtenidas, éstas se preservan en condiciones que permanezcan genéticamente estables, aunque por situaciones de adaptabilidad manifiesten cambios fenotípicos transitorios. La congelación se ha convertido en la elección con más ventajas por sobre las demás, pues éste es un método físico-químico que permite conservar viable por un tiempo, sin sufrir cambios genotípicos.

En este proceso, en donde se involucra el agua como microambiente y es la que cambia su estado; el material biológico inmerso en este medio debe adaptarse a las condiciones de este nuevo ambiente, transformar la velocidad de su metabolismo, conservar su viabilidad y evitar que los cristales de hielo formados por el cambio de temperatura del agua le ocasione alguna modificación. Para esto, se emplean criopreservantes los cuales impiden por interacción molecular con el agua, la acción destructiva del congelamiento sobre las células, es decir, protegen a las cepas bacterianas de la formación de cristales de hielo al atrapar la molécula de agua en su interior; en consecuencia, la solidificación del medio se establece

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

con una distribución desordenada del agua, evitando dañar el material biológico. Dentro de las sustancias más utilizadas en la conservación bacteriana a bajas temperaturas, se encuentran: sustancias ricas en proteínas como la leche, el suero, el extracto de carne, entre otros.⁴⁵

A nivel comercial, se encuentran disponibles productos para extraer y purificar DNA, que cuentan con todos los amortiguadores y materiales necesarios para realizar una extracción muy sencilla y en corto tiempo, con estos estuches comerciales se obtienen resultados reproducibles, material de alta pureza y peso molecular, la principal limitante de estas técnicas es el costo y la poca cantidad de DNA recuperada.⁴³

Un aislamiento de DNA total consta de los siguientes pasos: lisis celular, extracción del ADN, purificación y precipitación. El estuche comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, WI, EUA) está diseñado para purificar ADN de diferentes tipos celulares: células de la sangre, células animales y cultivo de tejidos, material vegetal, levaduras y bacterias. El proceso consta de cuatro pasos principales; 1) lisis celular, en donde se interrumpen las interacciones moleculares de la membrana celular y membrana plasmática, permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. 2) digestión con RNasa, la RNasa es una nucleasa que cataliza la degradación del RNA en componentes más pequeños. Esto permite que el producto quede limpio de ARN. 3) precipitación salina de proteínas: en esta etapa se separa el DNA de las proteínas y lípidos mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación; y finalmente 4) concentración del ADN por eliminación de

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

sales y precipitación con isopropanol, el DNA es menos soluble en este solvente, por lo que al usarlo precipita más rápido, aunque con menor concentración.^{44, 46}

Tras la extracción total de DNA, el material biológico obtenido debe ser desecado para retirar residuos de los solventes empleados en los lavados y almacenado en crioconservación a 4°C, ya que se seguirá empleando para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa, mejor conocida como PCR (por sus siglas en inglés), se sabe que el objetivo de esta técnica es copiar millones de veces una secuencia específica de DNA blanco, mediante una reacción de catálisis, realizada por una enzima cuyo nombre es Taq DNA polimerasa, de tal manera que cantidades mínimas de DNA pueden ser sintetizadas y copiadas para su análisis posterior.^{47, 50}

Los elementos esenciales para la mezcla de reacción son el molde (DNA o DNAC), que contiene la región de DNA que se va a amplificar, la enzima Taq DNA polimerasa, que lleva a cabo la reacción de catálisis; los cebadores o primers, que delimitan la zona de DNA a amplificar; los desoxirribonucleótidostrifosfatados conocidos como dNTPs, (adenina, timina, guanina, citosina), que son las bases nitrogenadas empleadas para construir las nuevas cadenas de DNA; el ion magnesio (Mg^{+}), el cual actúa como cofactor de la enzima; un buffer amortiguador, el cual mantiene el pH adecuado para el correcto funcionamiento de la Taq DNA polimerasa, y H_2O con un grado de pureza elevado, que es empleada como solvente. Algunos estuches comerciales, ya venden estas mezclas preparadas, en donde lo único que se les adiciona es el molde de DNA, los cebadores y el agua grado molecular.^{48, 49, 50}

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Todos estos reactivos interactúan en tres etapas; la desnaturalización, en donde las cadenas de DNA son calentadas a 95°C y separadas, las cuales sirven como molde para el siguiente paso. La hibridación, es donde los cebadores se alinean con su secuencia complementaria para que se forme el complejo molde-cebadores a una temperatura media (T_m) que es la óptima y oscila entre 50-60°C y en la etapa de extensión, en donde la Taq polimerasa actúa sobre el complejo formado y comienza su función catalítica, a una velocidad muy rápida, los dNTPs crean las cadenas completas de DNA, la temperatura para que se lleve a cabo esta fase es de 72°C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo se forman los amplicones, que no es más que el producto de esta reacción, con un tamaño total de pares de bases.⁴⁸

Estas tres etapas constituyen un ciclo y corresponde a una copia. La PCR se completa repitiendo entre 25 y 35 veces las tres etapas descritas anteriormente, en un equipo llamado termociclador, el cual establece un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo establecidos para que cada etapa no se modifique en ninguno de los ciclos.^{48, 49}

Para saber si la reacción de PCR transcurrió eficientemente, el análisis se realiza a través de un corrimiento electroforético en geles de agarosa y posterior visualización en un fotodocumentador. El DNA íntegro se debe observar en forma de una banda estrecha cercana al pozo en que se agregó el producto de la PCR. Si llegase a estar dañado o fragmentado se observa una banda de más de un cm de ancho o un camino luminoso en el carril.^{49, 50, 51}

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

En este procedimiento, los ácidos nucleicos se encuentran sometidos en un campo eléctrico, la carga neta negativa del DNA hace que se muevan al polo positivo que es el ánodo, a través de un gel formado por una malla tridimensional de un polímero como lo es, la agarosa. La fricción generada por el campo electromagnético sobre la malla tridimensional, provoca que las moléculas de mayor tamaño migren más lento, mientras las de menor tamaño avanzan más rápido en el gel, permitiendo que las diferentes moléculas se separen en función de su tamaño.^{50, 51}

El rango de tamaños que pueden separarse en un gel de agarosa oscila desde 50 pb a 40 kb, dependiendo de su concentración; es decir, cuanto más baja sea la concentración de agarosa, mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa. Dichos geles se corren en una cámara de electroforesis horizontal, con un campo eléctrico uniforme y constante, proporcionado por una fuente de poder.⁵¹

Para la preparación del gel se necesita de los siguientes reactivos; a) agarosa que es un polímero lineal compuesto por residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glucosídicos α (1-3) y β (1-4) y que al solidificar forman una malla tridimensional como se mencionó previamente. b) solución buffer o amortiguadora TBE 5x (Tris base, ácido bórico, EDTA) la cual brinda el pH adecuado que es de 8, para que se lleve a cabo el procedimiento. c) Bromuro de etidio, que es un agente intercalante, (ya que se intercala entre las bases nitrogenadas), y se emplea como colorante fluorescente para observar los ácidos nucleicos. Durante la polimerización del gel, se coloca un peine sobre la

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

base que lo contiene, al retirar dicho peine se forman los pocillos, donde se depositan las muestras a analizar.⁵¹

Una vez preparado el gel, se cargan las muestras a cada pozo agregando buffer de carga, el cual debe tener alta densidad que permita que la muestra se deposite en el fondo del pocillo del gel, además de colorantes; los cuales indican que distancia lleva el recorrido y si se debe detener la electroforesis. De igual manera a un pocillo del gel, de preferencia el primero, se añade marcador de peso molecular, un estándar de referencia que contiene fragmentos de DNA de longitudes conocidas, el que se empleó para este estudio fue el de 100 pb de la marca Promega. Se recomienda analizar el gel en un fotodocumentador, que incluye una fuente de luz ultravioleta, la cámara o equipo fotográfico para la toma y digitalización de imágenes y un equipo de cómputo para realizar distintos análisis más detallados.⁵¹

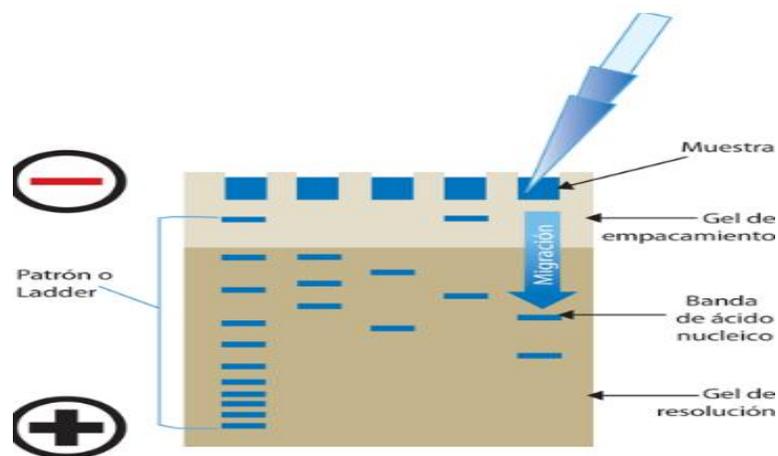


Figura 4. Corrimiento electroforético sobre un gel de resolución, en donde las muestras cargadas en los pozos, migran por la aplicación de un campo eléctrico del polo negativo (cátodo) al polo positivo (ánodo).⁵⁶

3.8 Almacenamiento del DNA bacteriano

Una vez que el DNA bacteriano ha sido purificado y analizado mediante electroforesis, el material biológico es almacenado en un ultracongelador a -20°C o a -80°C , para una preservación por varios meses. Es conveniente que el DNA se conserve en soluciones con bajas concentraciones de sales, para inhibir la acción de DNAsas contaminantes.⁵⁰

4. Planteamiento del problema

Klebsiella pneumoniae como causante de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) ha tenido un incremento desproporcionado en los últimos años. Debido a que su afectación es muy variada (tracto urinario, pulmones, tejidos blandos, área quirúrgica y sepsis) y a su alta resistencia a los antibióticos β -lactámicos, las infecciones que causa son de difícil tratamiento, ya que las opciones terapéuticas cada vez son más limitadas.

Su presencia en las heces (colonización intestinal), convierten a *K. pneumoniae* en un potencial reservorio sobre todo de resistencia antimicrobiana y puede predisponer al paciente a infecciones recurrentes y a la transmisión cruzada. En los pacientes oncológicos, donde los mecanismos de defensa se encuentran disminuidos, las IAAS son uno de los principales determinantes de morbilidad y mortalidad. *K. pneumoniae* se considera entre los de mayor importancia médica por su frecuencia en aislamientos y su multidrogoresistencia.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Una característica muy importante de *K. pneumoniae*, es su alta resistencia a los antibióticos β -lactámicos, principalmente por la producción de β -lactamasas, enzimas que hidrolizan dichos medicamentos, entre las cuales las de mayor interés son las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas. Dichas β -lactamasas son un grupo muy heterogéneo de enzimas que confieren distintos grados de resistencia; en la actualidad hay descritas más de 1400.

Por lo anterior; *Klebsiella pneumoniae* (BLEE) está siendo aislada de muestras de pacientes atendidos en el Hospital Infantil de México y que se encuentran inmunocomprometidos por el tratamiento contra el cáncer que están recibiendo; se considera necesario conocer el genotipo y la prevalencia de las BLEES presentes, para así aplicar el tratamiento-antibiótico adecuado para su control y de esta manera poner al paciente pediátrico infectado a salvo. Además existe limitada información relacionada con *K. pneumoniae* productoras de BLEE que colonizan intestinalmente a pacientes pediátricos oncológicos.

De esta manera, se pudo plantear lo siguiente: ¿Cuáles son los tipos de genes codificantes de BLEE que presentan las cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes pediátricos oncológicos?, ¿Tiene relación el género del paciente pediátrico oncológico con la presencia de los genes codificantes de BLEE?

5. Hipótesis

En numerosos estudios se ha descrito la presencia intrahospitalaria de enterobacterias β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) que presentan genes codificantes TEM, SHV, CTX-M y OXA, así como combinaciones de dos o más tipos de estos. Partiendo de esta premisa, al obtener colonias aisladas de *Klebsiella pneumoniae* (BLEE) a partir de pacientes pediátricos oncológicos, éstas presentarán los genes codificantes antes mencionados y sus posibles combinaciones. Además, existirá asociación entre la presencia de estos genes codificantes y el género de los pacientes que presentaron infección por *Klebsiella pneumoniae* (BLEE).

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Determinar los tipos de genes codificantes de BLEE en cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes pediátricos oncológicos.

6.2. Objetivos específicos

- Extraer DNA cromosómico de las cepas de *Klebsiella pneumoniae*.
- Estandarizar las PCR multiplex que nos permitan identificar los diferentes genes codificantes de BLEE.
- Determinar la presencia de genes de resistencia de *Klebsiella pneumoniae* (Kpn-BLEE).
- Determinar cuál es el tipo de gen de resistencia más prevalente en cepas de *Klebsiella pneumoniae* BLEE positiva.
- Determinar si existe asociación entre el género de cada paciente y la presencia de cada uno de los genes que codifican las enzimas β -lactamasas de espectro extendido.
- Determinar el perfil de resistencia a los β -lactámicos.

7. Diseño del estudio

Estudio descriptivo longitudinal y analítico.

7.1. Universo de estudio

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes pediátricos oncológicos y que estas fueron identificadas como multidrogoresistentes.

7.2. Criterios de inclusión

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes pediátricos oncológicos.

7.3. Criterios de exclusión

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* que no provenían de pacientes pediátricos oncológicos.

7.4. Variables

7.4.1. Variables dependientes

Variable	Escala de medición
Cepas positivas a los genes codificantes de las enzimas β -lactamasas de espectro extendido	Cuantitativa continua
Pacientes pediátricos oncológicos colonizados con <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE	Cuantitativa continua

7.4.2. Variables independientes

Variable	Escala de medición
Genes codificantes de las enzimas β -lactamasas de espectro extendido	Cualitativa nominal
Género de los pacientes pediátricos oncológicos colonizados con <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE	Cualitativa nominal

7.5. Análisis estadístico

Se realizaron tablas de frecuencias para determinar, de acuerdo al género de los pacientes, cuáles genes presentaron cada una de las 45 cepas y determinar la predominancia de alguno de los genes sobre los demás, también se aplicó la prueba no paramétrica de Chi cuadrada, para determinar si existe asociación entre el género de los pacientes y cada uno de los genes presentes en las cepas, en donde: si $p < 0.05$ existe asociación y si $p > 0.05$ no existe asociación. Puesto que Chi cuadrada, parte del supuesto de que si las dos variables están relacionadas existe dependencia y si no están relacionadas existe independencia, es decir, si $p < 0.05$ existe una asociación y si $p > 0.05$ no hay asociación.⁵⁵ Dichas pruebas estadísticas se realizaron mediante el programa IBM SPSS 20.

8. Material y metodología

Tabla 7. Materiales, equipos y reactivos empleados para cada método.

Materiales, equipos y reactivos	Método
Tubos de plástico de 1 mL	Conservación de las cepas
Asas bacteriológicas de plástico	
Mechero de Bunsen	
Cajas Petri de plástico	
Medio base sangre	
Medio base leche	
Incubadora	
Congelador marca Revco	
Marcador permanente	
Cajas de plástico con divisiones	
Gradilla	
Mechero Bunsen	
Asas bacteriológicas	
Cinta masking tape	

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Gradilla	Aislamiento de colonias
Cajas Petri de plástico	
Medio base sangre	
Medio BHI (Infusión cerebro corazón)	
Incubadora marca Ríos	
Marcador permanente	
Palillos de madera	Extracción de DNA
Gradilla para tubos de 1.5 mL	
Asas bacteriológicas de plástico	
Marcador permanente	
Tubo eppendorf de 1.5 mL	
Solución de lisis marca Promega	
Vórtex marca VELP Scientifica	
Centrifuga marca EBA21 Hettich Zentrifugen	
Recipiente para desechos	
Agua potable	
Cloro	
Micropipetas de: 1-10 μL, 2-20 μL, 20-200 μL, 100-1000 μL	
Lisozima 20 mg/mL	
Incubadora	
Solución de lisis de núcleo marca Promega	
Termoblock marca Boekel	
RNAasa 10 mg/mL	
Solución de precipitación de proteínas marca Promega	
Refrigerador marca Polarstar	
Isopropanol al 70%	
Tubo eppendorf de 0.2 mL	
Etanol al 70%	
Congelador marca Revco	
Concentrador marca LABCONCO	
Puntas para micropipetas de color amarillo y azul	
Micropipeta de 20-200 μL	Formación de pools bacterianos
Solución de rehidratación marca Promega	
Termoblock marca Boekel	
Puntas para micropipeta de color amarillo	
Tubo eppendorf de 0.2 mL	
Gradilla	
PCR de Promega Master Mix premezclada al 2x	

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Cebadores específicos: TEM,SHV,OXA,CTX Gp-1, CTX Gp-9, CTX Gp-8/25, IMP,VIM,KPC,GES 1-9,11,PER 1 y 3, VEB1-6, SME, IMI, GIM, SIM, NDM, SPM, OXA,O29, OXA 98, O1, O2, O51, O10, O58, MOX, DHA, ACC, EBC, FOX, CMY2-M	Amplificación de DNA bacteriano por PCR Multiplex
Micropipetas de: 1-10 μ L. 5-50 μ L, 100-1000 μ L Agua grado molecular marca Promega Termociclador marca Thermo Fischer Scientific Gradilla para tubos eppendorf de 0.2 mL Espátula Vidrio de reloj Balanza analítica marca METTLER Matraz bola Probeta de 100 mL Agarosa TBE 0.5x Horno de microondas Daewoo Micropipeta de 2-20 μ L Puntas para micropipeta de color amarillo Bromuro de etidio Soporte para gel Peines Base para soporte de gel Cámara de electroforesis Buffer de carga Blue/Orange 6x marca Promega Marcador de peso molecular 100 pares de bases marca Promega Placa de plástico con pocillos Fuente de poder marca EP5-300X Fotodocumentador marca iBright CL1000 Computadora Base de datos Fotodocumentador marca iBright CL1000	
	Análisis de los genes de resistencia

8.1. Conservación de las cepas

En el Laboratorio de Investigación de Infectología se realizaba lo siguiente con cada muestra:

1. Una siembra masiva en cajas Petri con agar base sangre.
2. Se incubaron a 37°C durante 18hrs
3. Se revisó la morfología colonial y microscópica.
4. Se tomó una asada con suficiente cepa y se depositó en un tubo con 1mL de leche estéril.
5. Se realizó por duplicado el paso 4.
6. Se identificaron los tubos con el mismo nombre y número de bacteria.
7. Se agitaron los tubos en vórtex.
8. Se congelaron a -60°C.

8.2. Aislamiento de colonias

1. Con un palillo de madera, se tomó una pequeña muestra de cepa, raspando la superficie de la mezcla de leche con cepa del tubo congelado.
2. Se inocularon en placas de agar base sangre de carnero al 5%.
3. Se dejó secar el inóculo.
4. Se realizó la siembra mediante la técnica de estría cruzada.
5. Se incubaron las cajas a 37°C durante 18 hrs.

8.3. Extracción de DNA

Para la obtención y purificación de DNA se empleó un estuche comercial “Wizard Genomic DNA Purification™”, siguiendo el apartado “aislamiento de DNA

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

genómico de bacterias Gramnegativas” al cual se le realizaron las modificaciones descritas a continuación:

1. Se tomaron de 6 a 8 colonias aisladas de cada cepa.
2. Se depositaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL, que contenía 1 mL de solución de lisis.
3. Se agitó en vórtex hasta disgregar perfectamente el cultivo bacteriano.
4. Se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos.
5. Se decantó el sobrenadante.
6. Se añadieron 8 μ L de lisozima 20 mg/mL.
7. Se mezcló y se incubó a 37° C durante 30 minutos.
8. Se añadieron 150 μ L de solución de lisis de núcleo y se agitó en vórtex.
9. Se colocó el tubo eppendorf en el termoblock a 80° C durante 10 minutos.
10. Se añadieron 20 μ L de RNAsa 10 mg/mL y se incubó el tubo eppendorf a 37°C durante 15 minutos.
11. Se agregaron 50 μ L de solución de precipitación de proteínas.
12. Se agitó en vórtex durante 12 segundos y se incubó en hielo durante 5 minutos.
13. Se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos.
14. Se agregaron 250 μ L de isopropanol al 70% en un tubo eppendorf de 0.2 mL y se dejó enfriando.
15. Se adicionó el sobrenadante de la precipitación de proteínas en el tubo eppendorf de 0.2 mL que contenía isopropanol al 70%, se mezcló suavemente por inversión.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

16. Se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos.
17. Se decantó el sobrenadante y se desechó en un recipiente que contenía agua con cloro.
18. Se añadieron al mismo tubo eppendorf 250 μ L de etanol al 70%.
19. Se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos.
20. Se desechó el sobrenadante en el recipiente con agua y cloro.
21. Se repitieron los pasos 19 y 20.
22. Se secó el producto obtenido en un concentrador a 65°C durante 20 minutos.

El DNA obtenido se almacenó a -60°C hasta su procesamiento.

8.4. Preparación de pools de DNAs bacterianos

Una vez obtenido el DNA bacteriano, se realizó lo siguiente:

1. Se rehidrataron todos los tubos con 50 μ L de solución de rehidratación precalentada en el termoblock.
2. Se mezcló por inversión hasta homogeneizar el DNA en disolución.
3. Se tomaron 5 μ L del DNA de cada una de seis cepas y se mezclaron en un tubo eppendorf de 0.5 mL.

8.5. Hidratación de cebadores específicos para emplear en las PCRs Multiplex

A los cebadores liofilizados se les adicionaron las cantidades de agua necesaria para obtener una concentración de 100 μ L y a partir de esa preparación, se realizaron diluciones para obtener concentraciones requeridas de cada cebador.

8.6. Amplificación de DNA bacteriano por PCR Multiplex

Se procedió a la amplificación del DNA bacteriano utilizando la PCR de Promega Master Mix premezclada al 2x, empleando cebadores específicos para cada una de las PCRs descritos en la siguiente tabla:

Tabla 8. PCRs multiplex utilizadas para la búsqueda de genes codificantes de BLEE en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes pediátricos oncológicos, cebadores específicos empleados, tamaño de los amplicones y temperaturas medias (Tm) usadas en el termociclador.

PCR	Cebadores	Tamaño en pares de bases (pb)	Temperaturas medias(Tm) °C
I	TEM	800	60
	SHV	713	
	OXA	569	
II	CTXMGp-1	688	60
	CTXMGp-2	404	
	CTXMGp-9	561	
	CTXMGp-8/25	326	
III	IMP	139	55
	VIM	390	
	KPC	538	
IV	GES 1-9,11	399	57
	PER 1 y 3	520	
	VEB 1-6	698	
V	SME	334	60
	IMI	536	
VI	GIM	279	58
	SIM	613	61
	NDM	129	60
	SPM	447	60
VII	OXA	516	59
	O24	237	
	OXA 48	389	
VIII	O1GD2M	198	60
	O2GD2M	256	
	O51GD2M	497	
IX	O10	138	60

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

	O58	630	
X-1	MOX	520	60
	DHA	405	
	ACC	346	
	EBC	302	
X-2	FOX	247	60
	CMY2-M	106	

1. Se llevaron a cabo las mezclas de PCR Master Mix para cada par, tríada o cuarteto de cebadores específicos que correspondían a cada una de las mezclas de PCR. Cada PCR se realizó en un volumen final de 50 μ L:

	1x
H ₂ O (grado molecular)	39.5 μ L
Master Mix	7.5 μ L
Cebador	1.5 μ L
DNA	1.5 μ L

2. En un tubo eppendorf de 0.2 mL se añadieron los componentes para la PCR en las cantidades señaladas.
3. Se mezclaron las mezclas de los tubos, mediante una rápida centrifugación.
4. Se añadía la cantidad de DNA señalada de cada uno de los DNA a probar.

NOTA: Los controles negativos se prepararon de la misma forma, pero sin adicionarle muestra de DNA.

5. Se colocaban los tubos eppendorf de 0.2 mL con la mezcla de PCR en el termociclador.
6. Se programaba el termociclador para cada uno de los procesos de amplificación con las temperaturas correspondientes a cada gen de resistencia a detectar, mostradas en la tabla 2.

8.7. Electroforesis

Para el corrimiento electroforético se llevaron a cabo los siguientes pasos:

1. Se pesaron 0.525 g de agarosa.
2. Se añadieron a un matraz de bola.
3. Se vertieron por las paredes 35 mL de TBE al 0.5x y se agitó.
4. Se calentó en horno de microondas (en intervalos de 20 segundos cada vez), hasta la completa disolución de la agarosa.
5. Se enfrió la mezcla (aproximadamente 42°C).
6. Se añadieron 5 μ L de bromuro de etidio y se agitó el matraz.
7. Se vació el contenido del matraz a un molde para gel que previamente ya contenía los peines.
8. Se dejó enfriar hasta su gelificación.
9. Se llenó la cámara de electroforesis con TBE 0.5x.
10. Se sumergió el soporte con el gel en la cámara de electroforesis.
11. Para cada reacción, se mezclaron 5 μ L del producto de PCR con 1 μ L de buffer de carga y se adicionaron en el primer pocillo 5 μ L de marcador de peso molecular.
12. Se tapó la cámara de electroforesis conectando los electrodos a la fuente de poder y se encendió.
13. Se dejó correr por 1 hora a 70 volts y con 50 mA.
14. Se apagó la fuente de poder y se sacó el gel de agarosa al 1.5%.
15. Se reveló en el fotodocumentador.

8.9. Análisis de los genes de resistencia

Se analizó cada gel de agarosa al 1.5% en el fotodocumentador, buscando los fragmentos correspondientes y comparando las bandas formadas con las reportadas de acuerdo a su tamaño en pares de bases (pb). Todo esto se registró en una base de datos, la cual fue empleada para realizar el análisis estadístico.

9. Resultados

De 510 cepas identificadas como enterobacterias β -lactamasas de espectro extendido positivas, 45 cepas correspondieron a *Klebsiella pneumoniae*.

Todas las cepas utilizadas para este estudio, fueron entregadas por el Laboratorio Central de Bacteriología del Hospital Infantil de México, éstas se identificaron con el equipo automatizado VITEK®. Una vez crioconservadas las cepas a 4°C, se procedió a la extracción de DNA con el estuche comercial “Wizard Genomic DNA Purification™” para gramnegativas. Se corroboró dicha extracción de DNA cromosómico mediante un corrimiento electroforético.



Figura 5. Verificación de la extracción de DNA cromosómico de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* BLEE, por medio de la visualización de una banda en un gel de agarosa al 1.5%.

A cada una de las 45 cepas, se les realizaron 10 PCRs con los 32 pares de cebadores correspondientes a los genes codificantes de cada enzima BLEE a

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

analizar. Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* (BLEE) dieron positivo a la PCR I (genes TEM, SHV y OXA), PCR II (únicamente genes CTXMGp-1 y CTXMGp-9) y PCR VIII (genes O1GD2M, O2GD2M y O51GD2M).

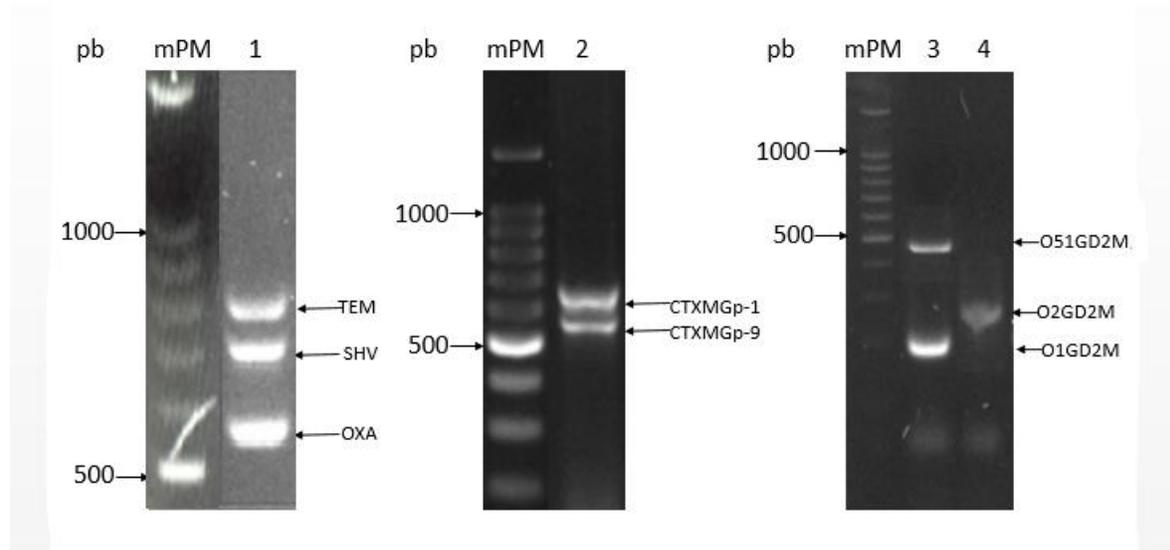


Figura 6. Patrones electroforéticos de los genes de BLEE detectados en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes pediátricos oncológicos. mPM; Marcador de Peso Molecular (100 pb).carril 1; PCR I, carril 2; PCR II, carriles 3-4; PCR VIII.

Con la PCR I realizada a las 45 cepas de Kpn, se determinó una frecuencia de 38 cepas positivas para TEM. Para SHV, se determinó una frecuencia de 34 cepas positivas. Para OXA, se determinó una frecuencia de 34 cepas positivas.

En la PCR II para el gen CTXMGp-1, se determinó una frecuencia de 40 cepas. Para CTXMGp-9 se determinó una frecuencia de dos cepas positivas para este gen codificante.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

En la PCR VIII, se determinó una frecuencia de 44 cepas positivas para el gen O1GD2M. En tanto para los genes O2GD2M y O51GD2M se encontró sólo una cepa positiva a ambos genes.

Tabla 9. Tabla de frecuencias de tipos de BLEE detectadas mediante PCRs en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de pacientes pediátricos oncológicos en el HIMFG. (n=45)

Genes	Cepa positiva		Cepa negativa	
	Frecuencia	Porcentaje (%)	Frecuencia	Porcentaje (%)
TEM	38	84.4	7	15.6
SHV	40	88.9	5	11.1
OXA	34	75.6	11	24.4
CTXMGp-1	40	88.9	5	11.1
CTXMGp-9	2	4.4	43	95.6
O1GD2M	44	97.8	1	2.2
O2GD2M	1	2.2	44	97.8
O51GD2M	1	2.2	44	97.8

En la tabla 9, se puede observar que el gen predominante es O1GD2M en las muestras de *Klebsiella pneumoniae* BLEE, con una frecuencia de 44 cepas positivas, de un total de 45 cepas y que corresponde al 97.8%. Esta enzima es perteneciente a las oxacilinasas (carbapenemasas), que dentro de la clasificación de Ambler corresponde a la clase D.

*Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Klebsiella pneumoniae* colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos*

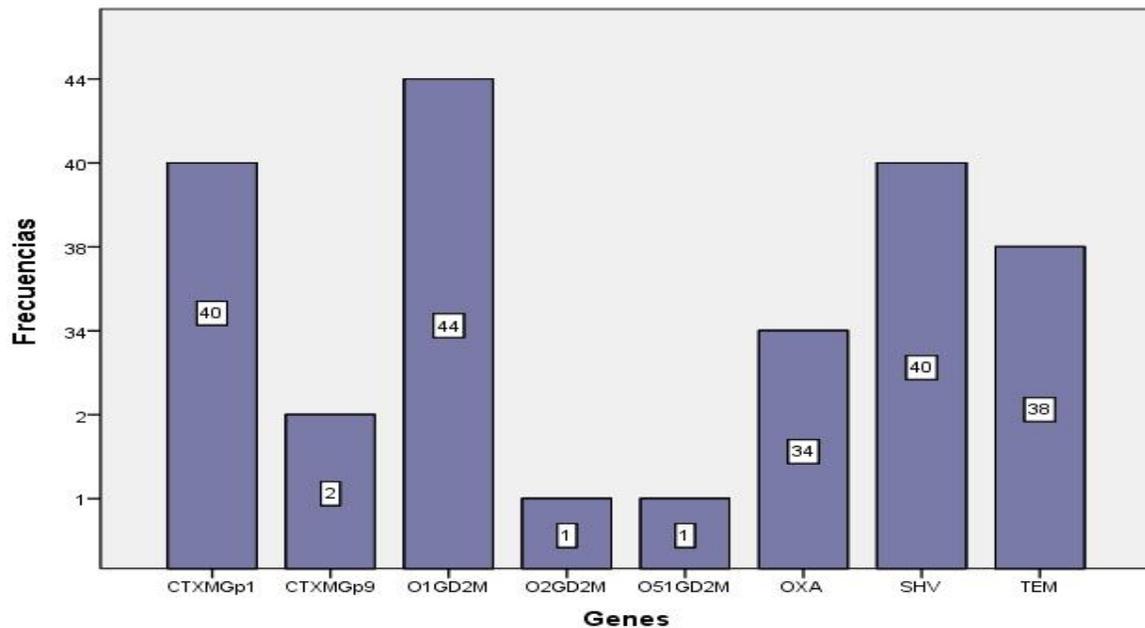


Figura 7. Representación gráfica de las frecuencias de los genes presentes en las 45 cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE.

Con respecto a la asociación del género con la presencia de β -lactamasas, las 45 muestras obtenidas provinieron de 21 pacientes de los cuales, 8 pacientes (38.1%) fueron hombres y 13 pacientes (61.9%) mujeres, con un rango de edad para ambos géneros de 1 a 14 años. A cada uno de los genes positivos en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, a los 8 pacientes hombres y a las 13 pacientes mujeres, se le aplicó la prueba no paramétrica Chi cuadrada.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Tabla 10. Prueba no paramétrica Chi cuadrada para los genes codificantes de las enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en las 45 cepas de *Klebsiella pneumoniae* y su asociación con el género (mujer u hombre) de cada uno de los pacientes.

Gen	Género	Positiva (presente)	Negativa (ausente)	Valor de significancia "p" obtenido en la prueba Chi cuadrada
TEM	mujer	30	3	.069
	hombre	8	4	
SHV	Mujer	29	4	1.000
	Hombre	11	1	
OXA	Mujer	24	9	.699
	Hombre	10	2	
CTXMGp-1-2	Mujer	30	3	.598
	Hombre	10	2	
CTXMGp-9	Mujer	0	33	.067
	Hombre	2	10	
O1GD2M	Mujer	32	1	1.000
	Hombre	12	0	
O2GD2M	Mujer	1	32	1.000
	Hombre	0	12	
O51GD2M	Mujer	1	32	1.000
	Hombre	0	12	

Sobre las características fenotípicas, los datos obtenidos de las cepas con respecto a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana fueron entregados por el Laboratorio Central de Bacteriología y realizadas con el equipo automatizado VITEK[®]. Interpretados bajo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100) del año 2019. Los antibióticos ensayados fueron: 1) ampicilina (AMP); 2) ampicilina-sulbactám (AMP-SUL); 3) piperacilina-tazobactám (PIP-TAZ); 4) ceftazidima (CEFTA); 5) ceftriaxona (CEFTRIA); 6) cefepime

Genes codificantes de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

(CEFE); 7) ertapenem (ERTA); 8) imipenem (IMIP); 9) meropenem (MEROP); 10) gentamicina (GENTA); 11) tobramicina (TOBRA); 12) ciprofloxacina (CIPRO); 13) moxifloxacina (MOXI); 14) tigeciclina (TIGE); 15) nitrofurantoina (NITROFU); 16) trimetroprime-sulfametoxazol (TRIME-SULFAME).

De las 45 cepas evaluadas con pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, se demostró que 2 cepas (5.7%) fueron resistentes a ampicilina-sulbactám, 2 cepas (5.7%) fueron resistentes a piperacilina-tazobactám, 2 cepas (5.7%) fueron resistentes a cefepime.

Tabla 11. Características fenotípicas y moleculares de *Klebsiella pneumoniae* BLEE positiva.^{68, 69, 71}

Cepa	Resistencia	Genes codificantes de BLEE
Kpn 04	AMP-SUL	TEM, SHV, OXA, O1GD2M, O2GD2M y O51GD2M
Kpn 05	CEFE	TEM, CTX-M
Kpn 25	PIP-TAZ	TEM, SHV, OXA, O1GD2M, O2GD2M y O51GD2M
Kpn 39	CEFE	TEM, CTX-M
Kpn 41	AMP-SUL	TEM, SHV, OXA, O1GD2M, O2GD2M y O51GD2M
Kpn 45	PIP-TAZ	TEM, SHV, OXA, O1GD2M, O2GD2M y O51GD2M

Kpn: *Klebsiella pneumoniae*; AMP-SUL: ampicilina-sulbactám; CEFE: cefepime;

PIP-TAZ: piperacilina-tazobactám; TEM: β-lactamasa de espectro extendido tipo

Temoneira; SHV: β-lactamasa de espectro extendido tipo variable de sulfhidrilo;

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

OXA: enzima tipo oxacilinasas; CTX-M: β -lactamasa de espectro extendido tipo cefotaximasa.

10. Discusión

Klebsiella pneumoniae (Kpn) es uno de los principales causantes de infecciones del tracto urinario, de neumonía y de infecciones intra-abdominales en pacientes hospitalizados, inmunocomprometidos con enfermedades subyacentes graves como el cáncer. Los tratamientos oncológicos que incluyen la radioterapia como la quimioterapia, pueden producir una mucositis, en este estado de disbiosis, ocasionado por los tratamientos; las bacterias pueden ingresar al organismo a través de la barrera mucosa dañada y de esta manera, llegar al torrente sanguíneo iniciando un proceso séptico.^{37, 38, 57}

Para contrarrestar la sepsis ocasionada por esta bacteria oportunista, se emplean antibióticos como los β -lactámicos, que son los más prescritos en atención primaria, en hospitales y en tratamientos contra infecciones en todo el mundo, especialmente en infecciones relacionadas con bacterias del género *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, la resistencia a estos agentes ha ido en aumento por la producción de diversos mecanismos en las bacterias, provocando que el antibiótico quede obsoleto y el tratamiento terapéutico sea insuficiente.^{21, 57}

Dentro de todos los mecanismos de resistencia presentes en las bacterias consideradas multidrogaresistentes, el mecanismo de interés en este estudio fue la producción de las enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Estas enzimas son capaces de hidrolizar un espectro más amplio de antibióticos β -

*Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Klebsiella pneumoniae* colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos*

lactámicos, incluyendo penicilinas, monobactámicos y la mayoría de cefalosporinas hasta las de tercera generación.^{13, 14, 25, 26}

La prevalencia y el genotipo de las enzimas BLEE varían según el país e incluso el hospital en el que se han aislado.⁵⁸ Este estudio demostró que de los 32 genes codificantes de BLEE buscados en las 45 cepas de Kpn productoras de BLEE (Kpn-BLEE) sólo estuvieron presentes 4 genes codificantes: CTXMGp-1 en 40 cepas (88.9%), SHV en 40 cepas (88.9%), TEM en 38 cepas (84.4%), CTXMGp-9 en 2 cepas (4.4%). Comparando con un estudio realizado en Polonia con cepas de Kpn-BLEE, obtenidas de pacientes pediátricos, donde obtuvieron una alta prevalencia de dos o inclusive hasta tres genes codificantes a β -lactamasas, observamos que nuestro hallazgo de frecuencia de CTX-MGp-1 es similar, ya que dicho estudio reporta (91.2%), sin embargo para SHV y TEM nuestro estudio muestra mayores frecuencias para estos genes, indicando que en ese país SHV es el gen menos común (11.8%), seguido por TEM (63.5%).⁶² Confirmando lo anterior, otro reporte de la India, indica que en 39 cepas de Kpn-BLEE provenientes de pacientes con un amplio rango de edad (desde recién nacidos hasta adultos mayores de 70 años), se detectaron múltiples β -lactamasas, de las cuales genes de la familia CTX-M (82%) eran los más prevalentes, seguido de TEM (36%).³³ Otro estudio reportado en China, con muestras que también incluían pacientes pediátricos y adultos, menciona a SHV (74.5%) como el más prevalente, en tanto que escasamente se encontraron genes de la familia CTX-M (25.5%) y a diferencia de nuestro estudio, genes de la familia TEM, no fueron detectados.⁶⁴ Arabia Saudita, confirma que la combinación de los genes más prevalentes en

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Kpn-BLEE provenientes de pacientes adultos, fueron CTX-M (100%), SHV (96%) y TEM (84%), en ese orden, similar a lo obtenido en este estudio, pero con diferentes porcentajes.²⁷ En Tanzania, reportaron el análisis de Kpn-BLEE de pacientes pediátricos demostrando como menos prevalente a CTX-MGp-9 (5.5%), coincidiendo con lo hallado en este estudio.⁶⁵ En Japón se reportó que la familia CTX-M está presente en cepas de Kpn-BLEE obtenidas de adultos con infección. El gen más prevalente fue CTXMGP-9 (53.8%), seguido de CTXMGP-1 (46.2%), mientras que no fue detectado el gen CTXMGP-2.⁶⁶

Como pudimos detectar en este estudio, los genes codificantes de BLEE con mayor prevalencia fueron los pertenecientes a la familia CTX-M, coincidiendo con lo reportado en estudios realizados en todo el mundo; ya que tiene presencia en Asia, en países como China, Corea, Japón e India, en América Latina, Norte América y en Europa.^{26, 35, 52, 54} Confirmando lo anterior, un estudio en Irán reportó que la familia de CTX-M (87.09%) son las enzimas con mayor prevalencia en 39 cepas de Kpn-BLEE de pacientes adultos, en ese país.³⁵ Dos estudios realizados en México, con muestras provenientes de pacientes con un rango de edad de neonatos hasta adultos mayores, reportaron que en la familia *Enterobacteriaceae* los genes con mayor prevalencia pertenecen a la familia CTX-M, con exactitud el gen CTX-M-15 seguidos de genes de la familia SHV, coincidiendo con lo reportado en este estudio.^{52, 54} Otro estudio realizado en Sudáfrica, reportó que el gen codificante para SHV en cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE es un gen cromosómico normal, además coincide con lo reportado en este estudio

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

puesto que confirma que los genes codificantes para la familia CTX-M son los más prevalentes a nivel mundial, en especial el gen codificante para CTX-M-15.²⁶

En cuanto a los cuatro genes que pertenecen a la familia de las Oxacilinasas (OXA), las 45 cepas de Kpn-BLEE analizadas en este estudio mostraron las siguientes frecuencias: O1GD2M 44 (97.8%), OXA 34 (75.6%), O2GD2M 1 (2.2%) y O51GD2M 1 (2.2%). Siendo el más prevalente O1GD2M, seguido de OXA. Comparando con un estudio en la India en donde analizaron 151 aislamientos provenientes de adultos infectados con Kpn, 122 dieron positivo a BLEE y 59 (39%) de estas cepas presentaron OXA-1, indicando que en ese país OXA-1 no es prevalente como en este estudio.⁶⁷

A nivel mundial, la presencia de genes codificantes de estas enzimas con respecto al género es muy variable y la mayoría de los reportes no incluye un análisis estadístico para esta asociación, limitando de esta manera la información obtenida. En este estudio se encontró que de 45 aislamientos correspondientes a Kpn-BLEE, 8 (38.1%) pacientes correspondieron al género masculino y 13 (61.9%) pacientes correspondieron al género femenino, esta información se corroboró con la prueba no paramétrica de Chi cuadrada, determinando que no existe asociación en términos de género.

Un estudio en Irán, reveló que de 100 muestras de Kpn-BLEE aisladas, 58 (58%) mujeres y 42 (42%) a hombres y que el rango de edad fue de 5 a 79 años, sin embargo no se reportó evidencia para esta asociación.⁵⁹ Otro estudio en Turquía reveló que la mayoría de los pacientes pediátricos con bacteremias provocadas

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

por Kpn-BLEE, 37(63.8%) eran hombres y 24 (61.5%) mujeres, en donde se reportó por medio de Chi cuadrada que no existe asociación en términos de género.⁶⁰Otro estudio en España reportó que de 51 neonatos infectados con Kpn-BLEE, 30 (59%) eran mujeres y 21 (41%) eran hombres, sin reportar evidencia para esta asociación.⁶¹Otro estudio en Guinea reportó que de 133 pacientes pediátricos infectados con Kpn-BLEE, 76 (57%) eran hombres y 57 (43%) eran mujeres, sin reportar evidencia para esta asociación.⁶³

El análisis de nuestros hallazgos nos reveló, que para cada gen presente en cada una de las 45 cepas el valor obtenido de significancia o “p” es mayor a 0.05 lo que quiere decir que el género no tiene asociación con el gen que está presente en cada cepa de Kpn-BLEE; por lo tanto se rechaza la hipótesis, concordando con un estudio realizado en Turquía, en donde determinaron, de igual manera; por medio de Chi cuadrada que no existe asociación en términos de género obteniendo una significancia de $p=0.99$.⁶⁰

Uno de los limitantes para este estudio fue la escasa información disponible a nivel mundial, sobre todo para pacientes pediátricos. Existe más información con respecto a pacientes adultos infectados con esta bacteria Kpn-BLEE. Además se debe mencionar que diversos estudios reportan la presencia de BLEE en muestras de toda la familia *Enterobacteriaceae* sin hacer énfasis en ninguna en particular, dificultando el hallazgo de información relevante en cuanto a Kpn. Actualmente existen muy pocos reportes que mencionan si la presencia de β -lactamasas se puede atribuir o no al género del paciente, aunque para este estudio salió negativa esta asociación, sería importante en un futuro seguir investigándolo.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Por otro lado, se determinó el perfil de resistencia a los β -lactámicos por medio de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. En donde se emplearon 16 antibióticos, para este estudio se descartaron los antibióticos que no fueron β -lactámicos, (gentamicina, tobramicina, ciprofloxacina, moxifloxacina, tigeciclina, nitrofurantoina, trimetroprime-sulfametoxazol).

A pesar de que las 45 cepas estudiadas presentaron genes codificantes para las enzimas β -lactamasas de espectro extendido (TEM, SHV, CTXGp-1, CTXMGp-9, OXA, O1GD2M, O2GD2M y O51GD2M) que les confieren resistencia a los β -lactámicos, la terapia antibiótica ejercida en el HIMFG está siendo efectiva, pues sólo seis cepas (13.3%) presentaron resistencia a la misma; cepa Kpn 04 y Kpn 41 resistentes a ampicilina-sulbactám; cepa Kpn 05 y cepa Kpn 39 resistentes a cefepime; cepa Kpn 25 y cepa Kpn 45 resistentes a piperacilina-tazobactám.

Tomando en cuenta que la ampicilina y la piperacilina son β -lactámicos que pertenecen al subgrupo de las penicilinas más un inhibidor de betalactamasas (sulbactám, tazobactám) respectivamente, se ha reportado que las enzimas como TEM, SHV y OXA pueden hidrolizar una gran variedad de estos antibióticos. Además se ha reportado, que las enzimas TEM y CTX-M pueden hidrolizar cefalosporinas de tercera y cuarta generación, como lo hicieron con el antibiótico Cefepime al ser una cefalosporina de cuarta generación.^{68, 69, 71}

Prácticamente todas las *Klebsiella pneumoniae* producen bajos niveles de SHV. El espectro de actividad de esta β -lactamasa incluye amino y carboxipenicilinas, es por eso, que a pesar de los bajos niveles de enzima, *Klebsiella pneumoniae*, es

*Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Klebsiella pneumoniae* colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos*

naturalmente resistente a ampicilina (AMP), amoxicilina (AMX), carbenicilina (CAR) y ticarcilina (TIC). TEM es una enzima comúnmente encontrada en bacterias gramnegativas. Las sustituciones de aminoácidos que ocurren dentro de la enzima TEM ocurren en un número limitado de posiciones, provocando varias alteraciones sutiles en los fenotipos BLEE, como la capacidad de hidrolizar oxiiiminocefalosporinas específicas, como ceftazidima (CEFTA) y cefotaxima (CEFO), además de hidrolizar cefalosporinas de tercera y cuarta generación.^{71, 72}

Las enzimas CTX-M han sido reconocidas como las más prevalentes entre las bacterias pertenecientes de la familia *Enterobacteriaceae*. Estas enzimas no están relacionadas con el grupo de las TEM o las SHV, pueden hidrolizar la cefotaxima (CEFO), la ceftriaxona (CEFTRIA) y el cefepime (CEFE) con mayor eficacia que a la ceftazidima (CEFTA).^{71, 73}

Las β -lactamasas de clase D se denominaron enzimas de tipo oxacilinasas (OXA), por su capacidad de hidrolizar la oxacilina (OXA) y la cloxacilina (CLOXA), de igual manera confiere resistencia a ampicilina (AMP) y cefalotina (CF). Presentan una gran variabilidad en la secuencia de aminoácidos y se caracterizan porque son escasamente inhibidas por los inhibidores de las β -lactamasas y EDTA.⁷³

11. Conclusión

Se detectaron 4 genotipos codificantes para enzimas tipo BLEE en las 45 cepas de Kpn-BLEE, analizadas (TEM, SHV, CTXMGp-1, CTXMGp-9) y para las tipo Oxacilinasas también 4 genes codificantes (OXA, O1GD2M, O2GD2M y O51GD2M). Siendo el genotipo CTXMGp-1 el gen más prevalente en los pacientes atendidos por el departamento de Oncología del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

En comparación con la bibliografía revisada, la resistencia a los antibióticos β -lactámicos determinada dentro del HIMFG no es alarmante, pues no representa un riesgo de salud, ya que sólo seis cepas (13.3%) de un total de 45 cepas evaluadas fueron resistentes. Dicha resistencia coincide con la presencia de los genes codificantes TEM, SHV, CTX-M, OXA, O1GD2M, O2GD2M y O51GD2M identificados en las PCRs.

Con respecto a la hipótesis generada en este estudio, se confirma la presencia de genes codificantes, con mayor prevalencia los genes O1GD2M (97.8%), SHV (88.9%), CTXMGp-1 (88.9%) y TEM (84.4%). Por otro lado, los genes con menor prevalencia fueron OXA (75.6%), CTXMGp-9 (4.4%), O2GD2M y O51GD2M (2.2%). Sobre la asociación del género del paciente con la presencia de cada uno de los genes codificantes se rechaza esta premisa.

12. Perspectivas

La información obtenida en este estudio sobre los genes codificantes que contiene Kpn-BLEE servirá como base a los epidemiólogos, médicos e infectólogos en la identificación de las cepas de *K. pneumoniae* que están colonizando a los pacientes pediátricos oncológicos y de esta manera se evitarán futuros brotes de las mismas clonas resistentes aplicando el antibiótico-terapia adecuado y también para implementar mejoras en las estrategias para su contención y control. También este estudio puede dar la pauta para formar una red de información a nivel mundial y con ellos actualizar la información y complementar la ya existente.

13. Referencias

1. Cruz E.; Díaz G. Modelación molecular de antibióticos betalactámicos. *MediSur*. 2015; 21(1): 74-74.
2. Belloso H. Historia de los antibióticos. *Rev. Hosp. Ital. B. Aires*. 2009; 29(2): 102-111.
3. Medina D.; Machado M.; *et al.* Resistencia a antibióticos, una crisis global. *Revista médica Risaralda*. 2015; 21(1):74-74.
4. Pacheco L. La resistencia a antibióticos: El efecto colateral. *Horizonte Sanitario*. 2012; 11(1): 24-31.
5. López M.; Alarcón T.; *et. al.* Bacterias multi-resistentes y pan-resistentes en el Hospital Universitario de La Princesa. *Rev. Presc. de fármacos*. 2012; 18(2):17-32.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

6. Founou L.; Founou R.; *et. al.* Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. *Front Microbiol.* [Internet] 2016; 7 (1881): 1-19. Recuperado de: <https://pdfs.semanticscholar.org>
7. Seija V.; Vignoli R. Principales grupos de antibióticos. *CEFA.* 2008; 1(1): 631-647.
8. Alvo A.; Téllez V.; *et. al.* Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello.* 2016; 76: 136-147.
9. Esparza M. de J. Descripción General de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. *Antibióticos. Guía ABE.* 2008; 2.
10. Suárez C.; Gudíol F. Antibióticos Betalactámicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2009; 27 (2): 116-129.
11. Calderón G.; Ulate L. Resistencia antimicrobiana: Microorganismos más resistentes y antibióticos de menor calidad. *Rev. Méd. Costa Rica y Centroamérica LXXIII.* 2016; (621) 757-763.
12. De la Fuente N.; Villarreal J.; *et. al.* Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 2015; 46 (2): 7-16.
13. Shamsuzzaman S. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria and antimicrobial therapy in combination. *Bangladesh J Med Microbiol.* 2015; 9 (2): 1-2.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

14. Basak S.; Singh P.; *et. al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant Bacteria: A study. J. of P. [Internet] 2016; 1-5. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
15. Fariñas M.; Martínez L. Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2013; 31(6):402–409.
16. García P.; Mendoza A. Pruebas bioquímicas tradicionales y de alta resolución para identificación manual de enterobacterias. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 2014; 48 (2):249-254.
17. Washington C.; Stephan D.; *et. al.* Koneman, Diagnóstico microbiológico. Ed. médica panamericana. 6ª ed. Buenos aires; 2006. pp. 1696
18. Kenneth J.; George R.; Sherris. Microbiología médica. McGraw-Hill Education. 5ª ed. México; 2011.
19. Fernández M.; Martínez C.; *et. al.* Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive-care unit: Risks factors and key preventive measures for eradication in record time. An. Pediatr. 2019; 91(1): 13-20.
20. Echeverri L.; Cataño J. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. laetrea. 2010; 23(3):240-249.
21. Chi X.; Berglund B.; *et. al.* Characterization of clinically relevant strains of extended-spectrum β -Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* occurring in environmental sources in a rural area of China by using whole-genome

- Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos*
sequencing. Front. Microbiol. [Internet] 2019; 10(21):1-13. Recuperado de:
<https://www.frontiersin.org>
22. Barreto S.; Zambrano M.; *et. al.* Variaciones fenotípicas de susceptibilidad en cepas de *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial y su asociación con la formación de biopelículas. Investigación Clínica. 2009; 50(2):221-229.
23. Rivera M.; Rodríguez C.; *et. al.* Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella spp* y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. Rev. Perú Med. Exp. Salud Pública. 2015; 32(4):752-5.
24. Ghafourian S.; Sekawi Z.; *et. al.* Incidence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in patients with urinary tract infection. Sao Paulo Med. J. 2012; 130(1): 37-43.
25. Peralta G.; Lamelo M.; *et. al.* Impact of empirical treatment in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* Bacteremia. A multicentric cohort study. BMC Infectious Diseases. 2012; 12(245):1-7.
26. Founou R.; Founou L.; *et. al.* Whole genome sequencing of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized patients in KwaZulu-Natal, South Africa. Nature Scientific reports [Internet] 2019; 9(6266): 1-11- Recuperado de:
<https://www.nature.com/articles/s41598-019-42672-2.pdf>
27. Mustafa G.; Areej M.; *et. al.* Association between virulence factors and extended-spectrum Beta-Lactamase producing *Klebsiella*

- Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos*
- pneumoniae* compared to non producing isolates. Inter. Perspectives on Infectious Diseases. [Internet] 2017; 2017: 1-14. Recuperado de: <https://www.hindawi.com/journals/ipid/2017/7279830/cta/>
28. Nepal K.; Dutt N.; *et. al.* Extended-spectrum beta-lactamase and metallo beta-lactamase production among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from different Clinical samples in a tertiary-care hospital in Kathmandu, Nepal. Ann Clin Microbiol Antimicrob.2017; 16: 62.
29. Woerther P.; Burdet Charles; *et. al.* Trends in human fecal carriage of extended-spectrum β -Lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. Clin. Microbiol. Rev. 2013; 26 (4); 744-758
30. Navarro F.; Calvo J.; *et. al.* Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2011; 29(7):524–534.
31. Vignoli R.; Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. CEFA 2008; 1(1): 649-662.
32. Toussaint K.; Gallagher J. β -Lactam/ β -Lactamase inhibitor combinations: from then to now. Annals of Pharmacotherapy. [Internet] 2014; 1(13): 1-14. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/267735062_-Lactam_-Lactamase_Inhibitor_Combinations_From_Then_to_Now/
33. Parveen R.; Khan M.; *et. al.* Extended- spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* from blood cultures in Puducherry, India. Indian J Med Res.2011; 134(3): 392–395.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

34. Gautam V.; Thakur A.; et al. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae*: A multi-centric study from tertiary-care hospitals in India. Indian J Med Res. 2019; 149: 2018-2015.
35. Bialvaei A.; Kafil H.; et al. CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* and *Escherichia coli* isolates in Iranian hospitals. Braz J. Microbiol. [Internet] 2016; 47(3): 706-711. Recuperado de: <https://www.researchgate.net>
36. Valdovinos M. Microbiota intestinal en los trastornos digestivos. Probióticos, prebióticos y simbióticos. Revista de Gastroenterología de México. 2013; 78 (1): 25-27.
37. Molina E. Microbiota, microbioma y cáncer. SEBBM Div. 2018; 1 (1): 1-2.
38. Van L.; P.A.M.; et al. Clinical significance of translocation. Gut. 1994; 35 (1): 28-34.
39. Maldonado M. Infecciones en el paciente oncológico. Rev. Esp. Pediatr. 2013; 69 (3): 140-154.
40. Kluytmans M.; Rossen J.; et al. Whole-genome multilocus sequence typing of extended-spectrum-Beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*. J Clin. Microbiol. 2016; 54 (12): 1-9.
41. Fernández A.; García C.; et al. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. EIMC 2010; 1-52.
42. Britania Laboratorios. Hoja de seguridad de Cerebro corazón infusión agar. 1ra edición: Argentina; 2015. Recuperado

- Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos*
- de:https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a281eacb5ee1.pdf
43. Britania Laboratorios. Hoja de seguridad de agar MacConkey. 1ra edición: Argentina; 2015. Recuperado de: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2ed674cf661.pdf
44. Ríos E.; Calleros E.; *et al.* Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de DNA y su eficiencia de Genotipificación en población mexicana. *Acta Universitaria* 2016;26(4):56-65.
45. Gallou A.; Suaste D.; *et al.* Manual Prácticas del Laboratorio de Biología Molecular. SENASICA. 1ra edición: México; 2015.
46. Sánchez C.; Corrales C.; Congelación bacteriana: Factores que intervienen en el proceso. *NOVA*. 2005; 3 (3):109-113.
47. Tamay L.; Ibarra C.; *et al.* Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Inv. En Disc.* 2013; 2(2): 70-78.
48. Pérez A. M. Reacción en cadena de la polimerasa. *Uni. Poli. De Val.* [Internet]. 2011: 1-10. Recuperado de: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/>
49. Bolívar A. M.; Rojas A.; *et al.* PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en biomedicina*. 2014; 3 (1): 25-33.
50. Alejos L.; Aragón C.; *et al.* Extracción y purificación de ADN. INECC. 1ra edición: México; 2014.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

51. Lee P.; Costumbrado Y.; et. al. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. J. Vis. Exp. 2012; 6 (1): 2-5.
52. Barrios H.; Garza U.; et. al. ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: The most prevalent clinical isolates obtained between 2005 and 2012 in Mexico. J. Glob. Antimicrob. Resist. 2017; 10 (1): 243–246.
53. Aquino A.; Mérida J.; et. al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Mexico: Report of seven non-clonal cases in a pediatric hospital. BMC Microbiol. 2018; 18 (38): 1-8.
54. Uc A.; Gracida C.; et. al. High Prevalence of antimicrobial resistance among gramnegative isolated bacilli in intensive care units at a Tertiary-Care Hospital in Yucatán México. MDPI. 2019; 55 (588): 1-13.
55. Berlanga V.; Rubio M.J. Clasificación de pruebas no paramétricas. Cómo aplicarlas en SPSS. REIRE. 2012; 5(2): 101-113.
56. Salazar A.; Sandoval A. S.; et. al. Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. MacGraw-Hill. México; 2013.
57. Raei F.; Eftekhar F.; et. al. Prevalence of quinolone resistance among extended-spectrum β -Lactamase producing uropathogenic *Klebsiella pneumoniae*, Jundishapur. J Microbiol. [Internet]. 2014; 7(6):1-5 Recuperado de: <http://jjmicrobiol.com/en/articles/56363.html>
58. Kim M.; Lee H.; et. al. Molecular characteristics of extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and the prevalence of qnr in extended spectrum Beta-lactamase isolates in a tertiary-care hospital in Korea. Yonsei Med J. [Internet]. 2010; 51(5):768–774.

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

Recuperado

de:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2908884/#B24>

59. Yazdanesad S.; Alkhudairy K.; *et. al.* Preliminary survey of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in nosocomial uropathogen *Klebsiella pneumoniae* in north-central Iran. *Heliyon*. 2019; 5 (1): 1-6.
60. Tanir S.; Ozsurekci Y.; *et. al.* A comparison of blood stream infections with extended spectrum Beta-lactamase producing and non-producing *Klebsiella pneumoniae* in pediatric patients. *Italian Journal of Pediatrics*. 2017; 43(79): 1-7.
61. Prada M.; Martínez C.; *et. al.* Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive-care unit: Riskfactors and key preventive measures for eradication in record time. *AnPed*. 2019; 91:13-20.
62. Mrowiec P.; Klesiewicz K. *et. al.* Antimicrobial susceptibility and prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from pediatric and adult patients of two Polish hospitals. *New Microbiologic*. 2019; 42(4): 197-204.
63. Isendahl J.; Turlej A.; *et. al.* Fecal Carriage of ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* in children in Guinea-Bissau: A hospital-based cross-sectional study. *PLoSOne*. 2012; 7(12).
64. Liao K.; Chen Y.; *et al.* Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* causing

- Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos*
- intra-abdominal infections from 9 tertiary hospitals in China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2017; 87, 45-48.
65. Moremi N.; Claus H.; *et. al.* Faecal carriage of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* among street children dwelling in Mwanzacity, Tanzania. *PLoSOne.* 2017; 12(9).
66. Chong Y.; Shimoda S.; *et. al.* Community spread of extended-spectrum B-lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*: a long-term study in Japan. *Jour. Med. Mic.* 2013; 62:1038-1043.
67. Sugumar M.; Kumar K.; *et. al.* Detection of OXA-1 β -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* from blood stream infections (BSI) by conventional PCR and in-silicoanalysis to understand the mechanism of OXA mediated resistance. *PLoSOne.* 2014;9(3).
68. Casellas J. M. Resistencia a los antimicrobianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *API.* 2012; 30 (6): 519-528.
69. López Diana.; Torres M. I.; *et. al.* Genes de resistencia en bacilos gramnegativas: Impacto en la Salud Pública en Colombia. *Rev. Univ. Salud.* 2016;18(1):190-202.
70. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2019.
71. De Silva Y.; Ferrari R.; *et. al.* A global overview of β -lactam resistance genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Bentham Open.* 2019; 11(1): 22-34.
72. Galas M. *et. al.* Grupo KES. INEI. 2013; 1-52

Genes codificantes de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de Klebsiella pneumoniae colonizantes de pacientes pediátricos oncológicos

73. Rada A.; Hernández C.; et. al. Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia 2001-2016. Biomédica. 2019; 39(1):199-220.